

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIOVANNA CARSTENS CASTELLANO

EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA E DE PROTEÍNAS  
DE CHOQUE TÉRMICO (HSP 70) E SUA RELAÇÃO COM O GRAU DE  
EURIHALINIDADE EM EQUINODERMOS

CURITIBA  
2012

GIOVANNA CARSTENS CASTELLANO

EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA E DE PROTEÍNAS  
DE CHOQUE TÉRMICO (HSP 70) E SUA RELAÇÃO COM O GRAU DE  
EURIHALINIDADE EM EQUINODERMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Viviane Prodocimo

CURITIBA  
2012

Castellano, Giovanna Carstens

Expressão de transportadores de membrana e de proteínas de choque térmico (HSP70) e sua relação com o grau de eurihalinidade em equinodermos. / Giovanna Carstens Castellano – Curitiba, 2012.

83 folhas (4 coloridas).

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire

Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

1. Regulação de volume celular. 2.NAK. 3. NKCC. 4. Aquaporinas. 5. HSP70.  
I. Título.

CDD 635.9

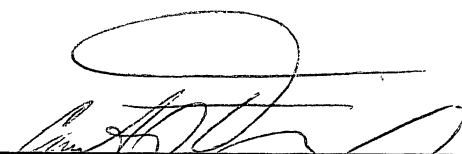
CDU 631.811.98

Termo de aprovação

por


**Giovanna Carstens Castellano**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:




---

Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire - UFPR  
Presidente e Orientadora



---

Dr. Paulo da Cunha Lana – UFPR



---

Dr. Edvaldo da Silva Trindade - UFPR

Curitiba, 13 de fevereiro de 2012.

Quantas vezes na vida nos intimidamos em demonstrar nossos sentimentos. E assim quantas vezes nos privamos de estar ainda mais próximos de alguém que amamos. Gostaria de aproveitar a oportunidade para homenagear pessoas muito importantes para mim. Rodolphinho, coisinha mais rica da mamãe, você é a pessoinha que eu mais amo na vida, razão da minha alegria. Pai e Mãe, meus amores, vocês são pessoas maravilhosas, que me deram muito amor e apoio desde sempre. Marcos, amado, companheiro de todas as horas boas e difíceis. Dedico a vocês este trabalho. Amo vocês e obrigada por tudo!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as graças e oportunidades que me foram dadas e que possibilitaram a conclusão de mais uma jornada.

À Professora Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire, pela continuidade de uma orientação que já completa 4 anos, pela paciência, por me ensinar que para ser cientista tem que ter paciência, perseverança e flexibilidade para ver alternativas diante dos resultados negativos. Por fim agradeço por me passar um exemplo de profissional no qual posso me espelhar.

À Professora Dra. Viviane Prodocimo, pela co-orientação, pelos conhecimentos passados, pelos reagentes de western blotting, e por me ensinar a encarar meus resultados frustrantes com senso de humor.

Ao Professor Dr. Edvaldo da Silva Trindade, pela acolhida, pelos reagentes para o ensaio de citometria de fluxo, pela ajuda e co-orientação, ainda que extra-oficiais. Obrigada também por me inserir um pouquinho no mundo celular.

À Professora Dra. Marta Marques de Souza, por passar seu protocolo de marcação de transportadores de membrana, explicar pessoalmente e com detalhes e ceder o soro de cabra para o mesmo ensaio.

À Professora Dra. Rosana Moreira da Rocha, por me ensinar a aperfeiçoar a escrita de textos científicos.

Ao Professor Dr. Jonathan Wilson, por ter cedido seu conhecimento e vasta experiência de western blotting para ajudar a mim, uma pessoa completamente desconhecida para ele.

À Professora Dra. Adriana Mercadante, por ter me sugerido alguns dos testes da HSP70.

À escola de mergulho “Pata da Cobra”, pela realização de todas as coletas de *Lytechinus variegatus*.

Ao pessoal do LFCO, inclusive professoras, pela ajuda em coletas, ensaios, tentativas e erros. Marcos Paulo Trindade da Veiga, obrigada por me acompanhar desde as primeiras coletas, por ter a calma que eu não tenho para recomeçar quando tudo está parecendo errado, por me ajudar no que for preciso independente do momento. Enelise Marcelle Amado, obrigada por me ensinar que jogar tudo fora, recomeçar, tentar e tentar de novo faz parte do universo profissional que escolhemos. Obrigada também por me ensinar a técnica da calceína, por me dar boas dicas de escrita. Silvia Millan obrigada por me ajudar na coleta mais gelada do ano e da vida, por diminuir minha ignorância em informática e por atender por telefone minhas dúvidas de western blotting. Anieli Maraschi obrigada pela ajuda e companhia no western blotting e no citômetro de fluxo. Juliane Ceron e Natascha Wosnick obrigada por terem sido mestrandas junto comigo e assim podermos compartilhar experiências. Luciana Rodrigues de Souza-Bastos obrigada por ter me dado uma nova esperança sobre meus géis, por ter contatado o Professor Dr. Jonathan Wilson em busca de ajuda para mim. Obrigada também por ter sido tão disponível para qualquer ajuda que precisei. Sônia Kaminski obrigada por ter me mostrado que é possível entrar em uma área de atuação completamente nova e desafiadora no pós-doutorado e ainda assim se sair muito bem e com

resultados surpreendentes. Por fim agradeço a todos vocês por terem sido não apenas colegas de laboratório, mas também amigos nas horas boas e nas mais difíceis da minha vida.

Ao pessoal do LIPS, especialmente ao Lucas, à Stelee e à Elisa por me acolherem e me ajudarem com as técnicas de biologia celular e citometria de fluxo. Lucas, muito obrigada pela disponibilidade e paciência.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, por ter disponibilizado prontamente a estrutura do IBMP (citômetro de fluxo) quando precisei.

Ao Professor Dr. Luiz Claudio Fernandes, pelo uso do leitor de placas e da centrífuga refrigerada de seu laboratório.

À Professora Dra. Ana Lúcia Tarathuch, por ter sido tão disponível ao me mostrar os princípios básicos do microscópio de fluorescência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, pela oportunidade e por recursos disponíveis.

Ao CNPq pela bolsa.

À Vera Maria Adelio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

Ao meu filho Rodolfo Castellano da Costa e Silva de Noronha Pessoa (Rodolfinho), por ser a pessoinha que mais amo na vida, razão da minha alegria e da minha força para nunca desanimar.

Ao meu marido Marcos Paulo Trindade da Veiga, por compartilhar a vida comigo, inclusive os inúmeros “chiliques” típicos de uma mestranda cansada de insistir em algo que, às vezes, parece que não vai dar em nada. E por me ensinar que às vezes é melhor ser feliz do que ter razão.

Aos meus pais, Augusto Carrano Castellano e Marília Carstens Castellano, por fazerem, desde sempre, tudo por mim e se realizarem a cada vitória conquistada. Por fazerem de cada conquista minha uma conquista deles também. Por abrirem mão de sua liberdade e serem tão amáveis e disponíveis. Por me ensinarem a ser gente e terem mostrado que priorizar a educação dos filhos vale a pena ainda que seja preciso levar a vida com um padrão muito aquém do que se deseja.

Aos meus irmãos, Patrícia Carstens Castellano (Paty) e Fabiano Carstens Castellano (Fá), cunhados, João Theodoro Venetikides (Jonto) e Erica Luiza Maria Zerbetto Assis Castellano e sobrinhos, Matheus Castellano Venetikides, Nicolás Castellano Venetikides e Frederico Assis Castellano, por estarem comigo para tudo até debaixo d'água.

À minha única avó ainda viva Íris Laura Locatelli Carstens, Vó Íris, por achar bonito eu ser a netinha que vai fazer até doutorado, e ser moderna e “descolada” a ponto de entender do que se trata tudo isso.

Agradeço à toda minha família, filhote, marido, pai e mãe, irmãos, cunhados irmãos, sobrinhos, Vó, por me amarem e serem meus amores, por acreditarem e confiarem em mim, por serem tudo de bom nesta vida. Em especial à criançada, por se apaixonarem pela vida e pelos animais junto comigo, por se contagiarem e terem vontade de ser biólogos e apresentadores do “Animal Planet” porque a tia é bióloga.

A alguns egressos do LFCO, Ivonete Aparecida dos Santos, Hugo Ultramari Batista, Lígia Strey e Aline dos Santos Klöh. Obrigada a todos pela amizade e

especialmente à Ivonete por ter sido minha companheira nos estudos dos equinodermos, e por termos transformado esta relação em uma grande amizade.

À Gabriela Dantur (Gaby), à Rosa Cordelli Lantmann, à Katherine Maria Sperkoski (Kety), ao Denilton Vidolin (Deni), ao Marlos Pedro Susla, à Fernanda Silva (Fer), à Ana Caroline Cabral (Catarina), ao pessoal do LFCO e egressos, pela amizade e companheirismo.

E a todos a quem esqueci de agradecer, mas que contribuíram de alguma maneira para que esta dissertação tenha se tornado possível.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

## RESUMO

Estuários e regiões de entremarés são ambientes marinhos bastante instáveis. Invertebrados marinhos são osmoconformadores e isosmóticos ao meio, então alterações de salinidade do meio desafiam suas células e tecidos. Sob tais desafios as células podem regular seu volume através de transportadores de membrana, por exemplo a bomba  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, o co-transportador NKCC e canais de água (aquaporinas). A capacidade de regular volume está relacionada ao seu grau de eurihalinidade. Equinodermos são exclusivamente marinhos, mas podem ocupar ambientes instáveis, onde ficam expostos a alterações de salinidade e temperatura. Estas alterações podem desafiar a regulação de volume de suas células, e podem também representar causa de desnaturação de suas proteínas, o que demanda a ação de chaperonas moleculares, como as proteínas de choque térmico da família das HSP70. Neste trabalho foram estudadas as espécies *Arbacia lixula* e *Lytechinus variegatus*, habitantes do sublitoral, e *Echinometra lucunter* e *Holothuria grisea*, residentes em entremarés. O objetivo foi relacionar o grau de eurihalinidade das espécies com sua capacidade de regular volume celular, também com a expressão constitutiva de transportadores de membrana e com a expressão de HSP70 sob alterações ambientais. Células obtidas do esôfago e do intestino destas quatro espécies foram expostas a choques hipo e hiperosmóticos na presença de calceína para avaliar a regulação de volume celular. Adicionalmente foram bloqueados transportadores de membrana e aquaporinas de *A. lixula* e *H. grisea* para permitir inferir o papel destas proteínas na regulação de volume celular. A expressão constitutiva dos transportadores das espécies foi mensurada por imunofluorescência em citômetro de fluxo. Foi avaliada a expressão de HSP70 em *L. variegatus* por SDS-page diante de estresses salino e térmico. Foi detectado sinal de redução regulatória de volume nos experimentos de choque hiposmótico (-50%) com células de esôfago de *L. variegatus* e de intestino de *H. grisea*, e choque de -20% com células intestinais de *A. lixula*. Nas demais condições, houve aumento progressivo de volume das células, também nos controles. A presença dos bloqueadores de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, NKCC e aquaporina gerou inchaço maior ainda das células, confirmando sua ação na regulação de volume celular. Os dados de imunofluorescência mostraram diferenças na abundância de transportadores entre as espécies. Não foram encontradas diferenças na expressão de HSP70 em *L. variegatus* nas diferentes salinidades. Conclui-se que as células de equinodermos são permeáveis, tendem a inchar em qualquer circunstância (pelos resultados com calceína), o que pode estar relacionado à não invasão da água doce por estes animais. Há baixa expressão de transportadores de membrana nas quatro espécies, e não foi detectada indução de expressão de HSP70 por alteração de salinidade em *L. variegatus*. Por fim, *A. lixula*, a espécie de ambiente mais estável, apresentou, de maneira geral, o menor desenvolvimento dos parâmetros

estudados: mostrou baixo sinal de redução regulatória de volume, baixo sinal dos transportadores, e não apresentou sinal de HSP70.

## ABSTRACT

Estuaries and intertidal regions are very unstable marine habitats. Marine invertebrates are osmoconformers and isosmotic to the external medium, thus alterations in the salinity of the water represent a challenge to their tissues and cells. Under those challenges cells can regulate their volume through the action of membrane transporters such as the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pump, the NKCC cotransporter, and the water channels (aquaporins). The capacity to regulate volume is related to the degree of tolerance to salinity changes, or degree of euryhalinity. Echinoderms are exclusively marine, but may occupy unstable coastal areas, where they are cyclically exposed to variations in salinity and temperature. These alterations can challenge the volume regulatory capacity of their cells, and may also cause protein denaturation, a situation which demands the protective action of the molecular chaperones such as the heat-shock proteins of the HSP70 family. In this work we investigated the subtidal species *Arbacia lixula* and *Lytechinus variegatus*, and the intertidal species *Echinometra lucunter* and *Holothuria grisea*. This study aimed at relating the habitat and degree of euryhalinity of those species with the capacity of their isolated cells to regulate volume when osmotically challenged, and also with the constitutive expression of membrane transporters and HSP70 under *in vivo* abiotic challenges (salinity and temperature). Cells were obtained from the esophagous and intestine of the urchins and were exposed *in vitro* to hypo- and hyper-osmotic shocks, in the presence of calcein, in order to evaluate their volume response. In addition, membrane transporters were blocked in order to allow inference of the role of those transporters in cell volume regulation (in *A. lixula* and *H. grisea*). Constitutive expression of the transporters was evaluated through immunofluorescence and flux cytometry. The expression of HSP70 was evaluated in *L. variegatus* through SDS-PAGE. A signal of regulatory volume decrease in the -50% hyposmotic shock was detected in cells from the esophagous of *L. variegatus*, and cells from the intestine of *H. grisea*, and also in the -20% hyposmotic shock in cells of the intestine of *A. lixula*. In the remaining conditions, there was a progressive increase in the volume of the cells, through the increased calcein signal, also in controls and cells submitted to the hyper-osmotic shocks. The presence of the blockers of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, NKCC and aquaporins has generated a greater degree of swelling of the cells, confirming the action of the transporters in cell volume regulation. Immunofluorescence data have revealed differences in the abundance of these transporters among species. No differences in the expression of the HSP70 in *L. variegatus* were seen in the different salinities. We can conclude that echinoderm cells are quite permeable, and tend to gain volume and swell under all conditions (calcein results), which may relate to their total inability to withstand freshwater. There is low expression of the membrane transporters tested in the 4 species; no change in HSP70 expression upon salinity challenge in *L. variegatus*. Finally, *A. lixula*, the species which inhabits the most stable

environment, displayed, in general, the lowest degree of development of all the parameters studied: showed small regulatory volume decrease signal, has shown a small signal for the transporters, and no signal at all for HSP70.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Exemplares de <i>Arbacia lixula</i> , <i>Echinometra lucunter</i> , <i>Lytechinus variegatus</i> e <i>Holothuria grisea</i> .....	31
<b>Figura 2.</b> <i>L. variegatus</i> sendo dissecado para coleta dos tecidos indicados, esôfago e intestino.....	36
<b>Figura 3.</b> Variação de volume das células de esôfago de <i>A. lixula</i> , <i>E. lucunter</i> , <i>L. variegatus</i> e <i>H. grisea</i> , sob choque osmótico.....	43
<b>Figura 4.</b> Variação de volume das células intestinais de <i>A. lixula</i> , <i>E. lucunter</i> , <i>L. variegatus</i> e <i>H. grisea</i> , sob choque osmótico.....	44
<b>Figura 5.</b> Variação de volume das células intestinais de <i>A. lixula</i> , sob choque osmótico, na presença de ouabaína, furosemida e $\text{HgCl}_2$ .....	47
<b>Figura 6.</b> Variação de volume das células intestinais de <i>H. grisea</i> , sob choque osmótico, na presença de ouabaína, furosemida e $\text{HgCl}_2$ .....	48
<b>Figura 7.</b> Variação de volume das células intestinais de <i>A. lixula</i> , sob choque osmótico, na presença de $\text{HgCl}_2$ sob as concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{M}$ .....	51
<b>Figura 8.</b> Expressão constitutiva de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPase e NKCC no intestino de <i>A. lixula</i> , <i>E. lucunter</i> , <i>L. variegatus</i> e <i>H. grisea</i> . Porcentagem de células intestinais marcadas e intensidade de fluorescência das células.....	53
<b>Figura 9.</b> Expressão de HSP70 em <i>L. variegatus</i> diante de variações de salinidade e temperatura.....	54

<b>Figura 10.</b> Ausência de expressão de HSP70 em <i>A. lixula</i> constitutivamente e diante de alterações de salinidade e/ou temperatura, expressão da mesma proteína em <i>H. grisea</i> em tecidos armazenados, marcador de peso molecular.....	55
<b>Figura 11.</b> Variação de hidratação tecidual de esôfago de <i>A. lixula</i> , <i>E. lucunter</i> , <i>L. variegatus</i> e <i>H. grisea</i> sob choque osmótico.....	59
<b>Figura 12.</b> Variação de hidratação tecidual de intestino posterior de <i>H. grisea</i> sob choque osmótico.....	59
<b>Tabela 1.</b> Diferenças na resposta de volume celular diante de desafio osmótico, em cada solução e tempo de incubação, entre os bloqueadores ou entre estes e a ausência dos mesmos.....	49

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	xiv
INTRODUÇÃO .....	17
OBJETIVOS .....	26
Geral .....	26
Específicos .....	26
HIPÓTESES .....	27
MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
Espécies estudadas .....	28
Coletas dos animais .....	32
Transporte e aclimação .....	32
Experimentos .....	33
Regulação de volume celular .....	33
Transportadores de membrana .....	36
Avaliação de expressão de HSP 70 .....	38
Considerações sobre a metodologia de avaliação de expressão de HSP70 .....	40
RESULTADOS .....	42
Regulação de volume celular .....	42
Transportadores de membrana .....	52
Expressão de HSP 70 .....	54
DISCUSSÃO .....	56
CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS .....	69

## INTRODUÇÃO

A água do mar oceânica é um ambiente bastante estável com relação aos demais ambientes aquáticos, e contém cerca de 35g de sal/ litro. Nas regiões mais rasas de contato com os continentes ou ilhas, encontram-se ambientes muito instáveis como a região de entremarés e os estuários. A região de entremarés apresenta variações bruscas de fatores abióticos, como salinidade e temperatura, durante a maré baixa, o que representa um desafio aos organismos que habitam esta região. Os invertebrados marinhos, inclusive os equinodermos, são essencialmente isosmóticos com relação à água do mar e osmoconformadores. Entretanto, a composição de solutos da água do mar e dos fluidos corpóreos destes animais podem ser diferentes, o que demanda certa capacidade de regulação iônica dos mesmos (Schmidt-Nielsen, 2002).

Animais osmoconformadores não investem energia em tais mecanismos, apresentando baixa capacidade de manutenção de gradientes osmóticos entre os meios interno e externo (Diehl & Lawrence, 1984; Freire *et al.*, 2008). Então, alterações ambientais acarretam alterações extracelulares (Stickle & Diehl, 1987).

As concentrações iônicas dos fluidos intra e extracelular diferem entre si, apesar de as osmolalidades destes serem as mesmas. Frente a tais diferenças, os organismos, principalmente os osmoconformadores como equinodermos, necessitam regular o volume de suas células para que as funções destas ou do organismo não sejam prejudicadas diante de alterações extracelulares (Pierce,

1982; Diehl & Lawrence, 1984; Diehl, 1986; Mongin & Orlov, 2001; Wehner *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2008). Sob condição hiposmótica ocorre entrada de água na célula e, portanto, seu inchaço, e sob condição hiperosmótica ocorre perda de água e a célula murcha (Diehl & Lawrence, 1984; Häussinger, 1996). Diante destas situações podem ocorrer, respectivamente, redução (RVD) ou aumento regulatório de volume (RVI), se houver mecanismo de regulação de volume celular (Häussinger, 1996). Se uma célula incapaz de regular seu volume for exposta a um choque osmótico, ela terá seu volume alterado de forma proporcional à intensidade da variação de salinidade de seu meio, devido à permeabilidade alta de sua membrana à água e baixa aos solutos. Ou seja, se for submetida a um meio 50% mais concentrado com relação ao isosmótico, por exemplo, perderá água até atingir 50% de seu volume inicial. Esse movimento de água leva a igualdade das concentrações interna (celular) e externa (do meio) e a célula estará funcionando assim como um osmômetro perfeito (Finan & Guilak, 2010). A regulação de volume ou “regulação isosmótica intracelular” (RII), se dá por meio de variações intracelulares nas concentrações de osmólitos orgânicos e inorgânicos (Pierce, 1982; Diehl & Lawrence, 1985; Diehl, 1986; Pierce & Politis, 1990; Hoffmann & Dunham, 1995; Häussinger, 1996; Schmidt-nielsen, 2002; Wehner *et al.*, 2003). Diante de exposição a baixas salinidades ocorre a perda de aminoácidos pelas células animais por meio de desaminação seguida de excreção de amônia; já sob altas salinidades ocorre o acúmulo intracelular de aminoácidos, mas os mecanismos

pelos quais isto se dá ainda não foram identificados em equinodermos (Diehl, 1986).

A regulação de volume celular, um processo fundamental à homeostasia celular, se dá pela ação de algumas proteínas de membrana, responsáveis pelo transporte de solutos, como a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase e o NKCC (Horisberger *et al.*, 1991; Haas & Forbush III, 2000; Russell, 2000; Jorgensen *et al.*, 2003).

As células animais são permeáveis à água de forma que a água se encontra em equilíbrio termodinâmico através da membrana celular e, portanto, as osmolalidades intra e extracelular são iguais. Isto acarreta que o volume de uma célula é determinado pela quantidade de solutos de seu interior. Assim, a manutenção e regulação de volume celular dependem do controle da quantidade intracelular de solutos (Russell, 2000). Gradientes de sódio e potássio entre as células e o fluido que as banha exercem importante função na regulação de volume celular (Horisberger *et al.*, 1991; Jorgensen *et al.*, 2003). Estes gradientes são gerados por transporte ativo, realizado pela  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase, uma proteína transmembrana localizada na porção basolateral das células, cuja função é transportar os íons em questão através das membranas celulares (Horisberger *et al.*, 1991; Kaplan, 2002). Tal transporte se dá de forma acoplada, sendo bombeados 3  $\text{Na}^+$  para fora da célula e 2 $\text{K}^+$  para dentro da mesma (Kaplan, 2002; Jorgensen *et al.*, 2003). A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase é a ATPase mais importante das células animais (Horisberger *et al.*, 1991), e está presente em quase todos os eucariotos (Wheatly & Gao, 2004). Há também, com importante função de regulação de volume celular, o cotransportador

NKCC, uma proteína de membrana amplamente distribuída entre os animais que transporta 1 Na<sup>+</sup>, 1 K<sup>+</sup> e 2 Cl<sup>-</sup> para dentro ou para fora das células. Há duas isoformas conhecidas para este transportador, sendo que NKCC1 é encontrada em epitélios secretores (porção basolateral dessas células) e em células não epiteliais, e NKCC2 está presente apenas nos rins. A atividade da NKCC1 é aumentada por reduções intracelulares da concentração de cloreto e de volume celular (Haas & Forbush III, 2000).

Também importantes na regulação de volume celular são as aquaporinas (King *et al.*, 2004), canais de água transmembrana presentes em todos os seres vivos (Campbell *et al.*, 2008; Finn & Cerdà, 2011), que podem permitir apenas a passagem de água ou desta acompanhada de pequenos solutos como o glicerol ou ureia (King *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2008). Há mais de 10 isoformas conhecidas dessa proteína, ocorrendo diferenças de permeabilidade entre elas (King *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2008). A permeabilidade das aquaporinas a água e solutos pode ser alterada por fosforilação, pH, concentração de cálcio extracelular (Campbell *et al.*, 2008). São responsáveis pelo balanço hídrico das células, portanto exercem importante papel na regulação de volume celular (King *et al.*, 2004). Mais especificamente, a aquaporina 1 é expressa constitutivamente, facilita o fluxo de água e pode funcionar como transportadora de cátions (Campbell *et al.*, 2008).

Animais osmoconformadores apresentam resposta de regulação de volume diante de situação hiposmótica, sendo que o retorno ao volume inicial é

mais rápido quanto maior for a capacidade de RVD da célula, e quanto mais eurihalino for o animal. Entretanto, raramente o volume é restaurado exatamente ao parâmetro inicial (Pierce, 1982; Häussinger, 1996). A capacidade de regular volume celular é parcialmente determinante do grau de eurihalidade dos osmoconformadores, mas não é suficiente para que estes animais tolerem alterações prolongadas de salinidade (Diehl & Lawrence, 1985; Santos-Gouvea & Freire, 2007; Freire *et al.*, 2008). Esta tolerância e a eurihalidade de um animal dependem de outros fatores como capacidade de manter estáveis as concentrações de seus fluidos corpóreos diante de alteração da salinidade ambiental, ou até mesmo de uma estratégia comportamental. O primeiro caso pode ser exemplificado por crustáceos e peixes que são osmorreguladores e apresentam uma ampla distribuição (Freire *et al.*, 2008). E o segundo é claramente demonstrado por moluscos, que sob condições desfavoráveis buscam se isolar do meio fechando suas conchas, se enterrando ou se deslocando para um ambiente menos hostil (Drouin *et al.*, 1984; Berger & Kharazova, 1997).

Embora exclusivamente marinhos, os equinodermos são encontrados em ambientes instáveis (Stickle & Diehl, 1987), sujeitos a variação de salinidade e exposição ao ar, como a região entremarés (McPherson, 1969; Hendler *et al.*, 1995). Variações de salinidade ocorrem naturalmente no mar em poças de maré, porém têm curta duração, cerca de 6 horas. No ambiente de entremarés é mais frequente a ocorrência de uma redução de salinidade do que de um aumento (Diehl, 1986; Stickle & Diehl, 1987). Em conformidade, a

regulação de volume celular em casos de ganho de água é mais viável do que nos de desidratação das células (Diehl, 1986; Freire *et al.*, 2008). Além disso, espécies maiores de ouriços-do-mar resistem por mais tempo a baixas salinidades (Stickle & Denoux, 1976; Diehl, 1986; Stickle & Diehl, 1987; Vidolin *et al.*, 2007), e tal resistência pode estar relacionada a uma capacidade de regulação de volume (Santos-Gouvea & Freire, 2007). Mas já foi apontada a inabilidade das holotúrias com relação a este mecanismo (Madrid *et al.*, 1976).

A capacidade limitada dos equinodermos para regular o volume de suas células pode acarretar às mesmas alterações intracelulares que representam condições desnaturantes. Então, a tolerância destes animais às alterações de fatores abióticos típicas do ambiente por eles habitado, pode se dever à presença de proteínas intracelulares capazes de evitar a desnaturação proteica, como é o caso das chaperonas, por exemplo HSP70 (Hartl, 1996; Fink, 1999; Place & Hofmann, 2001; Dahlhoff, 2004; Hofmann, 2005). As HSPs (“heat-shock proteins” ou proteínas de choque térmico) são proteínas celulares altamente conservadas, presentes em todos os seres vivos. Estas proteínas são nomeadas de acordo com seu peso molecular. Por exemplo, a família das HSP70 abrange proteínas de 68 a 73 KDa. As HSPs, inclusive a HSP70 expressas constitutivamente se ligam a polipeptídeos recém sintetizados, mantendo-os na respectiva conformação, sendo assim chamadas de chaperonas moleculares. São também responsáveis pela homeostase proteica e celular (Parsell & Lindquist, 1993; Feige & Polla, 1994; De Maio, 1999; Iwama *et al.*, 2004; Mayer & Bukau, 2005; Tomanek, 2008). A “heat shock response”

(HSR), ou resposta a choque térmico, é um dos mecanismos de defesa celular mais primitivos (De Maio, 1999). A HRS consiste em uma alta produção induzida das HSPs em resposta a fatores estressantes que ameacem a estrutura terciária das proteínas e o metabolismo celular (De Maio, 1999, Tomanek, 2008). Sob tais condições as HSPs se ligam a proteínas celulares, evitando que as mesmas desnaturem ou dobrando novamente as que perderam sua conformação original (Tomanek, 2008). Assim, as proteínas em questão funcionam como indicadores de estresse (Tomanek, 2008). Exemplos de estressores que induzem HSR são alterações térmicas (tanto resfriamento quanto aquecimento), de salinidade, de pH, isquemia, dessecação, muda (em lagostins), estresse de transporte, exposição a agentes químicos, a radiação UV, a radicais de oxigênio, a metais pesados, ao etanol, a análogos de aminoácidos, a inseticidas, a poluentes (Hofmann & Somero, 1995; De Maio, 1999; Aït-Aïssa *et al.*, 2000; Buckley *et al.*, 2001; Alfieri *et al.*, 2002; Deane *et al.*, 2002; Chang, 2005; Kültz, 2005; Diller, 2006; Berger & Emlet, 2007; Dong *et al.*, 2007; Poltronieri *et al.*, 2007; Dong & Dong, 2008; Dong *et al.*, 2008 a; Frenkel *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2008; Tomanek, 2008; Bahrndorff *et al.*, 2009; Eder *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009; Rhee *et al.*, 2009; Feldhaus *et al.*, 2010). A HSP70 especificamente também tem sua expressão induzida sob a maioria dos fatores estressores supracitados (Inseticidas, poluentes, componentes tóxicos, estresse de transporte, alterações de temperatura, de salinidade e dessecação) (Parsell & Lindquist, 1993; Feige & Polla, 1994; Hofmann & Somero, 1995; Aït-Aïssa *et al.*, 2000; Buckley *et al.*, 2001; Alfieri *et al.*, 2002;

Deane *et al.*, 2002; Chang, 2005; Kültz, 2005; Dong *et al.*, 2007; Poltronieri *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2008; Frenkel *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2008; Bahrndorff *et al.*, 2009; Eder *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Rhee *et al.*, 2009; Feldhaus *et al.*, 2010). A HSR dos organismos aquáticos varia com o grau de estabilidade de seu ambiente. Assim, animais que ocupam ambientes muito estáveis podem não ter a HSR (Tomanek, 2008). Já foi anteriormente verificada a relação entre expressão nula ou baixa de HSP70 ou do gene da mesma em animais de ambientes estáveis, como anfípodas que habitam um lago de temperatura bastante estável e invertebrados e peixes antárticos (Clark *et al.*, 2008 a e b; Timofeev *et al.*, 2008). Animais que habitam ambientes moderadamente estressantes, como o sublitoral, raramente apresentam a HSR e, quando a apresentam, o seu limiar ocorre sob temperaturas superiores às que ele encontra em seu habitat. No caso dos habitantes de costões rochosos da região de entremarés, um ambiente bastante instável e desafiador, expressam HSPs sob temperaturas típicas de seu ambiente (Tomanek, 2008). Relacionado a isso, sabe-se que o estresse térmico exerce um importante papel na distribuição de organismos de entremarés, em escala local (Miller *et al.*, 2009). Quatro gastrópodes habitantes da região de entremarés foram avaliados quanto à expressão de HSP70. *Lottia scabra* e *L. austrodigitalis*, que ocupam porções altas do costão rochoso, apresentaram maior expressão constitutiva de HSP70 do que *L. pelta* e *L. scutum*, que ocupam porções medianas e baixas. Uma alta expressão constitutiva da proteína em questão funciona como prevenção de habitantes de ambientes extremos a estressores

(Dong *et al.*, 2008 b). Resultados semelhantes foram encontrados no bivalve de entremarés *Mytilus trossulus*, cuja expressão de HSP70 é mais elevada no verão do que no inverno, e em indivíduos coletados na região de entremarés do que nos coletados no sublitoral (Hofmann & Somero, 1995).

Um pequeno estresse prévio resulta em expressão de HSP e, portanto, proteção para o desafio subsequente. A este mecanismo dá-se o nome de tolerância ao estresse (De Maio, 1999). No pepino-do-mar *Apostichopus japonicus* em estágio juvenil, por exemplo, a temperatura de aclimação altera o padrão de expressão de HSP70, o que significa ter influenciado no limite térmico superior de tolerância deste animal. Ou seja, quanto maior a temperatura de aclimação, maior a expressão de HSP70 e maior o limite superior de tolerância térmica (Meng *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados para a craca *Balanus glândula* (Berger & Emler, 2007), o bivalve *Mytilus trossulus* (Buckley *et al.*, 2001), ambos de entremarés. Também em *Apostichopus japonicus*, houve indução de tolerância ao estresse salino através de estresse térmico prévio. Com o estresse prévio foi verificada maior sobrevivência e maior expressão de HSP70 do que sem o mesmo (Dong & Dong, 2008; Dong *et al.*, 2008 a). Tal indução de tolerância a salinidade também foi encontrada em salmão (DuBeau *et al.*, 1998).

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

O objetivo geral do presente trabalho foi o de relacionar o grau de eurihalidade de quatro espécies de equinodermos com sua capacidade de regular volume celular e expressar proteínas de transporte e de estresse constitutivamente e sob desafios salinos e térmicos.

### **Específicos**

Os objetivos específicos foram:

Avaliar a capacidade de regulação de volume celular das células de esôfago e de intestino de quatro espécies de equinodermos, diante de choques hipo e hiperosmóticos;

Quantificar a expressão constitutiva de transportadores de membrana em células intestinais de quatro espécies de equinodermos;

Quantificar a expressão de HSP70 em *L. variegatus* diante de alterações de salinidade e temperatura.

## HIPÓTESES

A hipótese nula deste trabalho foi a de que as células de equinodermos apresentariam baixa capacidade de regulação de volume celular, baixa expressão de transportadores de membrana e alta de HSP70, com diferenças entre as espécies de acordo com a estabilidade dos seus habitats. Assim esperava-se que *A. lixula*, habitante do sublitoral, apresentasse a menor capacidade de regular volume celular e as menores expressões de transportadores de membrana e de HSP70, *L. variegatus*, habitante ocasional de estuário, parâmetros intermediários e *E. lucunter* e *H. grisea*, habitantes da região de entremarés, as maiores capacidades de regular volume celular e as maiores expressões de transportadores de membrana e de HSP70.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Espécies estudadas

*Arbacia lixula* (Fig. 1A) é um ouriço-do-mar de coloração marrom escura a negra, possuindo espinhos finos, longos e de pontas claras. É uma espécie que pode se alimentar de algas calcárias (Bulleri *et al.*, 1999), animais em decomposição, ou pequenos organismos. Ocorre na costa oeste da África, Ilhas Canárias, Madeira e Açores e em quase toda a costa brasileira, ocupando ambientes de até 15 m de profundidade e se fixando principalmente sobre substrato rochoso (Suguimoto, 2005). Habita o sublitoral, sendo mais abundante em ambientes estáveis, mais profundos (Sánchez-Jérez *et al.*, 2001), mas pode ocasionalmente, ser encontrada exposta ao ar na região de entremarés. *A. lixula* apresenta características que permitem sua ocorrência em locais que sofrem forte ação das ondas (Chelazzi *et al.*, 1997). Tais características são: discos adesivos grandes e com forte capacidade de adesão no substrato rochoso, hábito gregário e espinhos longos que se entrelaçam com os espinhos de outros indivíduos (Bulleri *et al.*, 1999). É uma espécie abundante em substratos verticais (Benedetti-Cecchi *et al.*, 1998; Bulleri *et al.*, 1999).

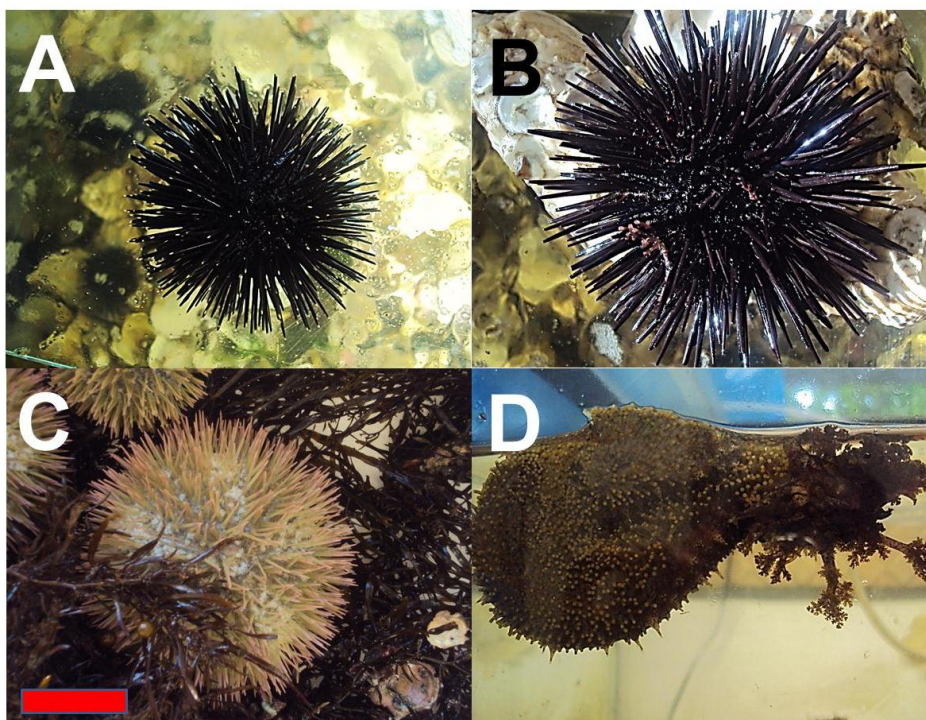
Foi também avaliado o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Fig. 1B), de cor preta arroxeadada, sendo uma das espécies mais abundantes do litoral brasileiro (Ribeiro-Costa & Rocha, 2006). Sua carapaça tem formato oval, podendo atingir até 15 cm de diâmetro, mas a maioria alcança somente metade

deste tamanho. Possuem espinhos longos, largos na base, mas que se afinam bruscamente no ápice, e de coloração geral escura (os espinhos orais são mais claros do que os aborais) (Hendler *et al.*, 1995). Os representantes desta espécie são herbívoros raspadores, podendo também se alimentar de restos de algas mortas (Ribeiro-Costa & Rocha, 2006) e de sedimento composto por carbonato de cálcio (McPherson, 1969). Podem habitar regiões de sublitoral raso, de costão rochoso em zonas de entremarés, em recifes de coral, sobre a alga *Thalassia testudinum* (McPherson, 1969). Nestas regiões frequentemente formam aglomerados e se alojam em locas (perfurações arredondadas nas rochas) (Ribeiro-Costa & Rocha, 2006; Gondim *et al.*, 2008). São encontrados em profundidades de 0 a 45 m e habitam substratos consolidados (Hendler *et al.*, 1995), sendo mais abundantes em águas rasas (Sánchez-Jérez *et al.*, 2001). Ocorrem em Beaufort, Carolina do Norte, Bermudas, em todo o Caribe, leste da América Central, Brasil e oeste da África. São ouriços relativamente resistentes a estresses causados por fatores físicos como aumento de temperatura e salinidade, mas os processos de fertilização e desenvolvimento são prejudicados sob baixas salinidades (Hendler *et al.*, 1995).

*Lytechinus variegatus* (Fig. 1C) é um ouriço-do-mar de cor branca, tendo espinhos de coloração roxa ou verde, que habita o sublitoral, mas pode ser encontrado em estuários (Drifmeyer 1981; Ernest & Blake 1981; Yara Aparecida Garcia Tavares, comunicação pessoal). Possui espinhos pequenos, carapaça hemisférica que pode atingir até 11 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura. Alimenta-se principalmente de algas, ocorre desde a Carolina do Norte

(EUA) até o Brasil, ocupando substratos arenosos, lodosos, costões rochosos e tapetes de algas (*Thalassia testudinum*) (Junqueira *et al.*, 1997). Este equinóide, quando habita sobre algas, exerce duas importantes funções: pastar (é o maior pastador dentre os equinóides) e produzir fezes que são fonte de nutrientes para animais detritívoros (Greenway, 1995). É uma espécie comum de águas calmas e seus representantes são intolerantes a águas turvas. Habitam profundidades de 0 a 250 m, mas ocorrem mais comumente a menos de 50 m de profundidade. O período reprodutivo destes animais ocorre com maior intensidade durante as estações da primavera, verão e outono; salinidades inferiores a 35 UPS causam diminuição na sobrevivência larval e na taxa de desenvolvimento, sendo que esta última cresce com aumento de temperatura (Hendler *et al.*, 1995). Fatores físicos (marés, radiação solar, ação mecânica das ondas, temperatura e dessecação) podem influenciar a mortalidade dos animais em questão, o que pode ainda ser agravado em alguns habitats, como é o caso da região entremarés. Em função do pequeno tamanho e da baixa capacidade de adesão em substrato rugoso (rochas) de seus discos adesivos, esta espécie fica restrita a regiões onde não haja forte ação mecânica das ondas (Sharp & Gray, 1962). A ocorrência cíclica de mortalidades em massa de *L. variegatus* pode ser relacionada às marés extremamente baixas ocorridas durante o dia. A morte dos animais provavelmente se deva à dessecação e à alta temperatura (Junqueira *et al.*, 1997).

O pepino-do-mar *Holothuria grisea* (Fig. 1D), comum na região de entremarés, é encontrado na base das rochas, em contato com a areia, podendo ficar totalmente exposta durante a maré baixa. Tem uma coloração acinzentada e ocorre na costa brasileira do nordeste até o estado de Santa Catarina (Ribeiro-Costa & Rocha, 2006). Podem atingir até 25 cm de comprimento. Ocorrem na Florida, nas ilhas Bahamas, Porto Rico, Jamaica, das Ilhas Antilhas a Curaçao, Panamá, Colômbia, sul do Brasil e oeste da África. São encontrados normalmente a menos de 5 m de profundidade (Hendler *et al.*, 1995).



**Figura 1.** Espécies estudadas neste trabalho: A. *lixula* (A), *E. lucunter* (B), *L. variegatus* (C) e *H. grisea* (D). Barra de escala = 5cm.

### **Coletas dos animais**

As coletas de *Holothuria grisea* (Selenka, 1867), *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) e *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) foram realizadas na Praia da Paciência (26° 46' 27" S, 48° 36' 02" O), Penha, Santa Catarina, manualmente durante a maré baixa. A Praia da Paciência possui um grande costão rochoso com abundância de organismos característicos deste tipo de ambiente, como: gastrópodes, bivalves, cnidários, equinodermos, crustáceos, etc. A temperatura média da água é de 20° C e a salinidade de aproximadamente 33 UPS.

A coleta de *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) foi realizada na Praia da Sepultura (27° 08' 28" S, 48° 28' 42" O), Bombinhas, Santa Catarina, por mergulho autônomo. A praia da Sepultura é do tipo arenosa. Os exemplares da espécie em questão são encontrados sobre a areia na região de sublitoral. A temperatura da água é de cerca de 20° C, com salinidade de aproximadamente 33 UPS.

### **Transporte e aclimação**

Os espécimes coletados foram transportados em caixas de isopor e envolvidos por algas, até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, onde foram aclimatados por cerca de 5

dias a salinidade de 35 UPS, temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ , aeração e filtração constantes. Durante o período de aclimação *A. lixula* foi alimentada com fragmentos de peixe, e os demais animais com algas marinhas, permaneceram sob fotoperíodo natural, e o pH da água foi medido diariamente e corrigido para cerca de 8,2. Após o período de aclimação foram realizados experimentos com os animais.

## **Experimentos**

### **Regulação de volume celular**

Para este experimento foram utilizados animais das quatro espécies, e a metodologia adotada foi retirada de Amado e cols. 2012 (metodologia adaptada de Hamann *et al.*, 2002; Capó-Aponte *et al.*, 2006). Os animais foram retirados diretamente do aquário estoque, crioanestesiados e seus tecidos (esôfago e intestino posterior) foram coletados (Fig. 2). As células destes tecidos foram dissociadas em PBS contendo 5 mM de EDTA, sendo o tecido picotado com bisturi e agitado com auxílio de uma pipeta Pasteur. A suspensão de células resultantes foi filtrada em malha com poros de  $30\mu\text{m}$  para eliminação dos restos de tecido. As células obtidas foram contadas em câmaras de Neubauer e cada amostra se constituiu de cerca de  $10^6$  células colocadas em um poço de uma placa preta (Optiplat 96-well, Black). Foi mensurada a autofluorescência das células de cada amostra, estas foram incubadas por 1 h em solução do

fluoróforo Calceína-AM (4mM) Sigma-Aldrich a 10 $\mu$ M em solução isosmótica, e a entrada de calceína nas células foi acompanhada a cada 3 min no leitor de placas (Tecan Infinite M200, Áustria), através da medição de aumento de intensidade de fluorescência ao longo do tempo. Então as células foram lavadas uma vez e foi lida a curva de fluorescência em solução isosmótica (470 mM NaCl; 54 mM MgCl $\cdot$ 6H $_2$ O; 10 mM CaCl $_2$  e KCl; 5 mM glicose, glicina e hepes; 2 mM NaHCO $_3$ , pH8,2) a cada 30 s, num total de 5 min. Por fim, em cada amostra foi colocada uma solução controle (isosmótica) ou experimental (com osmolalidades reduzidas e aumentadas em 20 e 50%, através de modificação proporcional na quantidade dos 4 primeiros sais citados da composição) e foi lida a curva de fluorescência a cada 30 s, durante 20 min. Além disso, para o intestino de *A. lixula* e *H. grisea* foram aplicados os choques osmóticos de mesma intensidade, mas com adição de 100 $\mu$ M de ouabaína (bloqueador da Na $^+$ ,K $^+$ -ATPase segundo Horisberger *et al.*, 1991; Kaplan, 2002), 100  $\mu$ M de furosemida (bloqueador de NKCC segundo Haas & Forbush III, 2000) e 300  $\mu$ M de HgCl $_2$  (bloqueador de aquaporina) (conforme Marinelli *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2005; Amado *et al.*, 2011), separadamente, para verificar se os transportadores de membrana em questão são ativados diante dos choques osmóticos impostos. Sabe-se pela propriedade “fluorescence self-quenching” (Hamann *et al.*, 2002; Capó-Aponte *et al.*, 2006) dos fluoróforos, que a um aumento na intensidade de fluorescência se atribui aumento de volume celular, e à diminuição da mesma se atribui redução de volume celular. Tais mensurações também foram realizadas no leitor de placas. Vale salientar

que as soluções utilizadas foram salinas enriquecidas com glicose e glicina, simulando o fluido celômico dos animais estudados; e a cada troca de solução a placa foi centrifugada para evitar perda celular. As centrifugações foram realizadas em centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Alemanha), por 5 min a 290 g e 16°C. Foi feita ANOVA de 2 vias com medidas repetidas para detectar diferenças entre as concentrações das soluções e entre os tempos 0, 2, 5, 10, 15 e 20 minutos, para cada tecido de cada espécie, com *post hoc* de Holm-Sidak para dados não normais (todos). Foi realizada Kruskal-Wallis ANOVA *on Ranks* para dados não normais. Para comparar a resposta das células aos choques osmóticos na presença de cada um dos bloqueadores e na ausência dos mesmos, foi feita Anova de 1 via, com *post hoc* de Holm-Sidak para dados normais e não-normais. Sempre o limite de significância utilizado foi de 0,05.

Após obter os resultados do bloqueio de aquaporina, percebeu-se que, embora a literatura traga altas concentrações de  $\text{HgCl}_2$  para tal função, 300  $\mu\text{M}$  pareceu muito agressivo às células de equinodermos, o que está justificado na discussão deste trabalho. Então foi realizado um teste de concentração de  $\text{HgCl}_2$  em *A. lixula* para bloquear aquaporina de células intestinais de equinodermos sob as condições isosmótica e anisosmóticas em 50%. As concentrações testadas foram de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 2.** *L. variegatus* sendo dissecado para coleta dos tecidos indicados, esôfago e intestino.

### Transportadores de membrana

Neste experimento foram utilizados animais das 4 espécies. Para a detecção da presença constitutiva de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase e NKCC, os animais (3 de cada espécie) foram crioanestesiados e tiveram seu intestino retirado (Fig. 2). Deste tecido foi obtida uma suspensão de células, da mesma maneira do que para o experimento de volume celular, e esta foi colocada em garrafa de cultivo em solução salina enriquecida com cálcio, glicose e glicina (mesma solução isomótica utilizada no experimento de regulação de volume celular), por 1 hora para que as células aderissem. A seguir a solução foi trocada para a remoção do material em suspensão, que constitui “debris” celulares, com a finalidade de evitar que este material atrapalhe a leitura no citômetro. As células aderidas foram soltas da placa pela incubação por 5 minutos com PBS contendo 2 mM de EDTA. Posteriormente, as células obtidas foram contadas em câmaras de Neubauer. Cada amostra foi normatizada em  $10^6$  células em

250  $\mu$ l. Estas foram fixadas por 30 minutos em paraformaldeído 2% em PBS. A seguir, as células foram lavadas em PBS, PBS contendo 0,1M de glicina (para bloqueio dos radicais aldeídicos livres) e, finalmente em PBS. Então, já que os sítios de ligação dos anticorpos são intracelulares, as células foram permeabilizadas durante o bloqueio de sítios inespecíficos, em PBS contendo 0,01% de saponina e 1% de BSA. Em seguida, as células foram expostas overnight a 4°C, para o anticorpo primário, diluído 1:250 em PBS contendo 1% de BSA. Após o período de incubação, as células foram lavadas por duas vezes com PBS, uma vez com PBS contendo 1% de BSA e novamente duas vezes em PBS. A seguir, as células foram incubadas com anticorpo secundário diluído 1:300 em PBS por 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente as células foram lavadas em PBS e então analisadas em citometria de fluxo BD FACSCalibur. Os controles foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, bem como na ausência de incubação (branco). Cabe destacar que as lavagens foram realizadas pela centrifugação das amostras, por 5 minutos a 2000 rpm em centrífuga CELM LS-3 plus, e em seguida ressuspensas na nova solução. Os anticorpos primários utilizados foram anti- Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase subunidade  $\alpha$ 1 IgG, produzido em camundongo, obtido do Hybridoma Bank, Iowa, EUA; anti-NKCC T4 IgG, produzido em camundongo, obtido do Hybridoma Bank, Iowa, EUA. O anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse IgG conjugado com fluoresceína, produzido em cavalo, Vector. A análise estatística dos dados para comparar a expressão de cada transportador de membrana entre as espécies, e a de ambos os transportadores em cada espécie foi realizada por teste t, mas

para dados não normais foi realizado o teste de Mann-Whitney Rank Sum. O limite de significância foi de 0,05.

### **Avaliação de expressão de HSP 70**

Este experimento foi realizado com *L. variegatus*, com n=5-6 para cada grupo experimental ou controle. Cada animal foi colocado em um aquário contendo cerca de 1,5L de água de salinidade 25 UPS ou 45 UPS (experimentais) ou 35 UPS (controle), temperatura de 10, 20 (controle) ou 35°C, e aeração constante, onde permaneceram por 6h. A diluição da água do mar foi realizada por adição de água doce filtrada (sem cloro) da torneira e a concentração da mesma foi feita por adição de sal marinho adquirido em loja de aquário. Ao final do tempo de exposição foi coletado o tubo digestivo de cada animal (Fig. 2) para determinação da expressão da proteína HSP70. Tais amostras foram imediatamente homogeneizadas no tampão de homogeneização com inibidores de protease (20 mM de benzamidina, 10 mM de EDTA, 10 mM de iodicetamida, 5 mM de fenantrolina e 2 mM de PMSF), tendo suas proteínas totais dosadas pelo método de Bradford, e sendo diluídas no tampão de amostra e fervidas antes do armazenamento em freezer a -80°C.

Proteínas extraídas dos tecidos foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, com sulfato de sódio-dodecil (SDS-PAGE). Cada amostra se constituiu de uma concentração de proteínas totais entre 32 e 58 µg, sendo posteriormente os dados normatizados para 50

µg. As amostras foram submetidas a um gel de empilhamento (acrilamida 5%) em tampão Tris contendo SDS (pH 6,8 ajustado com solução concentrada de Glicina) seguido do gel de separação (acrilamida 10%) também em tampão Tris contendo SDS (pH 8,8 ajustado com solução concentrada de Glicina). Foi utilizado o marcador de peso molecular Colorburst para eletroforese (1992-1vl, Sigma-Aldrich), para se ter o parâmetro de localização das bandas de 70KDa. A corrida se processou com a utilização de tampão de corrida de Tris-Glicina (pH 8,3) contendo SDS, por aproximadamente 4 horas com corrente de 10 mA até que as amostras ultrapassem o gel de empacotamento, passando a 15 mA até o final da corrida. A corrente foi gerada pela fonte da Amersham Pharmacia Biotech EPS 301. Imediatamente após a corrida os peptídios do gel foram transferidos para a membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blot contendo tampão de transferência com 25mM de Tris-Base, 192mM de Glicina, 0,04% de SDS, 20% de metanol e água até 4 L, com 120 mA de corrente, 25 mV, por aproximadamente 16 horas. A membrana foi retirada, a faixa com os marcadores de peso molecular foi cortada, e o restante da membrana foi lavada com tampão TBST, sendo 3 banhos de 5 minutos. Então, foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos com tampão TBST contendo 5% de leite Molico<sup>®</sup> Nestlé por 45-60 minutos. O material foi então incubado no anticorpo primário anti-HSP70 IgG1 produzido em camundongo (BD Biosciences) diluído 1:1000 a temperatura ambiente por 2 horas, na presença de leite Molico<sup>®</sup> 5%. Em seguida a membrana passou por 5 lavagens de 5 minutos em tampão TBST. Então o material foi incubado com o anticorpo secundário anti-mouse

IgG produzido em cabra (Sigma-Aldrich) conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:1000 em tampão TBST contendo 5% de leite Molico<sup>®</sup> Nestlé por 2 horas a temperatura ambiente. Foi então lavado 3 vezes com tampão TBST por 5 minutos cada. Em seguida o material foi revelado com o tampão ótimo para fosfatase alcalina contendo substratos para a fosfatase alcalina (cromógenos) BCIP/NBT, permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas das proteínas. Após o aparecimento das bandas, a membrana foi mergulhada em água destilada para parar a reação. A expressão das proteínas foi quantificada através da análise da intensidade relativa das bandas utilizando o programa ImageJ. Algumas bandas não ficaram nítidas o suficiente para serem analisadas de forma confiável e tiveram de ser eliminadas. Assim, a análise da intensidade relativa das bandas foi realizada com n=1 a 3. A análise estatística dos dados, para comparar a expressão de HSP70 sob condição controle e alterações de salinidade foi realizada por teste t. O limite de significância foi de 0,05. Como sob a temperatura de 10°C não apareceram bandas e sob 35°C apenas 1 banda pode ser considerada, não foi possível realizar a análise estatística dos dados relativos à temperatura.

#### Considerações sobre a metodologia de avaliação de expressão de HSP70

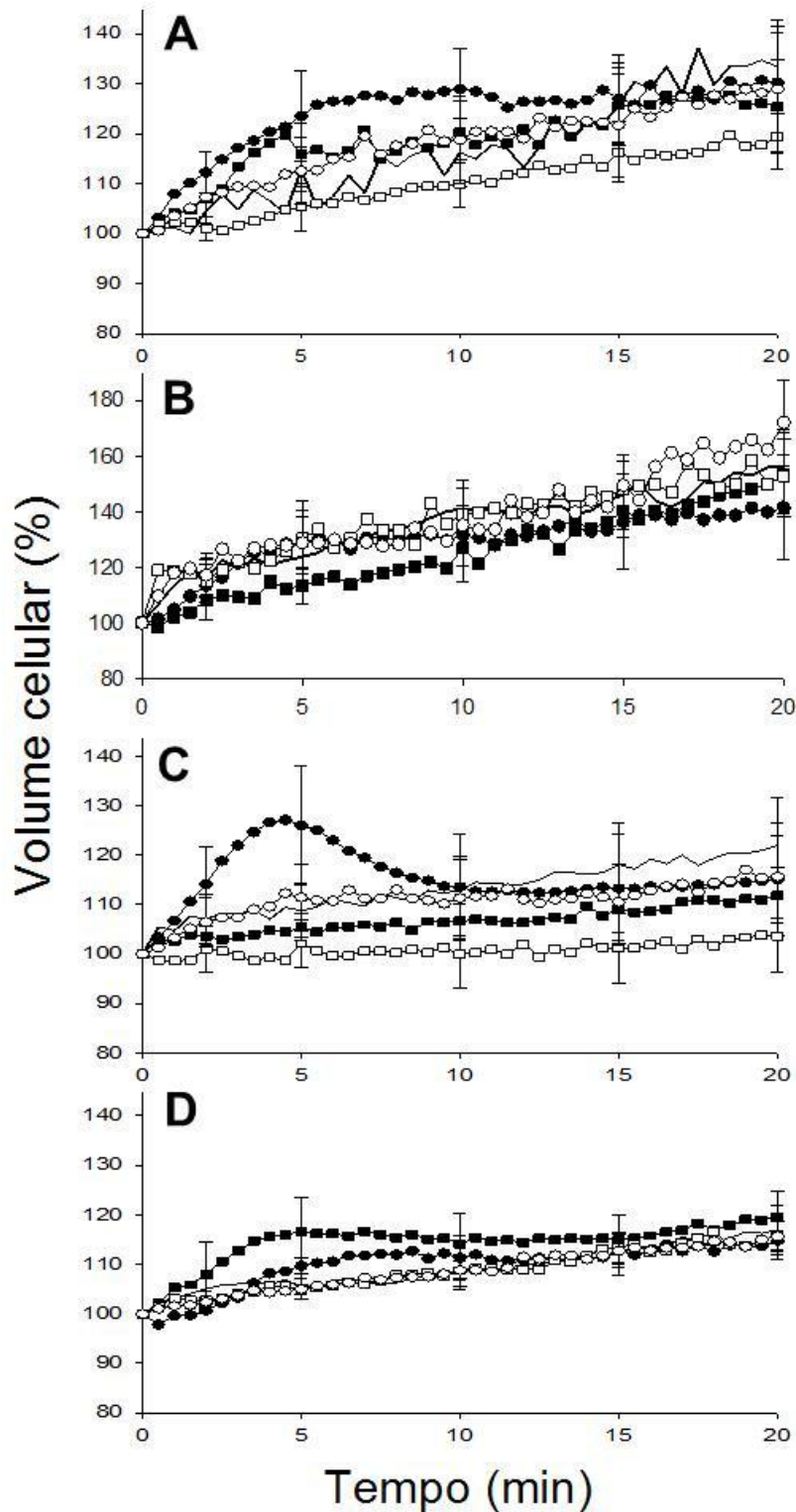
Cabe acrescentar que os resultados aqui apresentados foram os melhores conseguidos, após inúmeras tentativas de adaptação do protocolo. Foram testadas três diferentes concentrações de proteína por amostra (50, 100

e 200 µg), 3 concentrações de acrilamida do gel (8, 10 e 20%) duas marcas de anticorpos primários (Sigma-Aldrich e BD), três diluições do anticorpo primário (1:1000, 1:2000 e 1:4000), diferentes tipos de bloqueio de sítios inespecíficos (apenas 1h com leite Molico<sup>®</sup> a 5% em TBST, e 1h com leite Molico<sup>®</sup> a 5% em TBST e mais 1h com BSA a 1% em TBST). Além disso, foi realizado um controle negativo para verificar a possibilidade de ligação inespecífica do anticorpo secundário, ou seja, o anticorpo primário foi omitido e a membrana foi incubada apenas com anticorpo secundário. Chegou-se aos melhores resultados com 50 µg de proteína, gel de poliacrilamida com 10% de acrilamida, anticorpo primário anti-HSP70 da BD diluído 1:1000. O bloqueio foi realizado apenas com leite Molico<sup>®</sup>, pois não houve necessidade da presença de BSA, e o anticorpo secundário não apresentou ligações inespecíficas. Por fim, para eliminar a possibilidade de degradação de proteínas entre a retirada do tecido e a homogeneização com os inibidores de protease, algumas amostras de tecido foram retiradas dos animais e congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido. Não houve alteração nestas amostras, o que indica que não houve degradação de proteínas. Anteriormente à realização do ensaio com *L. variegatus*, este foi realizado com *A. lixula* e *H. grisea*, mas com 200 µg de proteína e com amostras armazenadas, não frescas. Ao ser percebida a ausência de expressão de HSP70 na primeira espécie e ao buscar a forma mais adequada de processar as amostras, optou-se por trabalhar apenas com os resultados oriundos de amostras frescas, ou seja, os de *L. variegatus*.

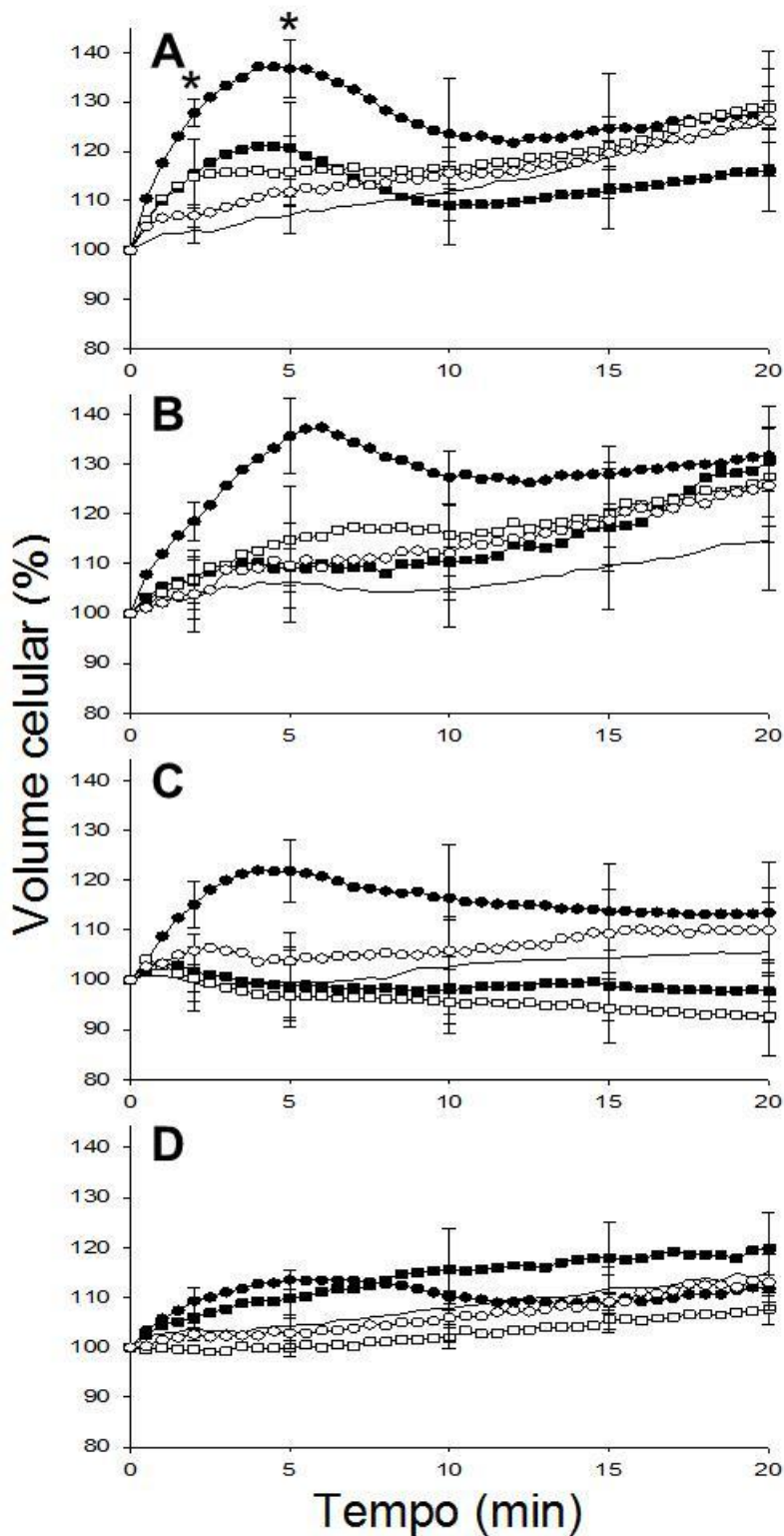
## RESULTADOS

### Regulação de volume celular

Para todas as espécies e ambos os tecidos, sob todas as soluções experimentais e controles (exceto nos controles de intestino de *E. lucunter* e *L. variegatus*), houve aumento de volume celular (Figs. 3 e 4). As células de esôfago de *E. lucunter* tiveram seus volumes aumentados além do que seria previsto para um osmômetro perfeito submetido aos choques osmóticos que foram impostos (Fig. 3B). Foram encontradas poucas diferenças entre a condição controle e as experimentais, sendo que apenas as células de intestino posterior de *A. lixula* (Fig. 4A), submetidos à diminuição em 50% na osmolalidade, tiveram seus volumes superiores aos volumes do controle após 2 e 5 minutos de exposição. As células intestinais de *H. grisea*, sob aumento em 20% na osmolalidade, mantiveram seu volume constante ao longo de todo o período de exposição (Fig. 4D). No caso de *L. variegatus*, percebeu-se, sob diminuição em 50% na osmolalidade, um aumento de volume das células de esôfago após 5 minutos de exposição, e o retorno à hidratação inicial em 10 minutos de experimento. Estas mesmas células, sob ambas as alterações (redução e aumento) em 20% na osmolalidade, mantiveram seu volume constante ao longo de todo o experimento (Fig. 3C). O mesmo ocorreu para as células intestinais desta espécie sob todas as condições experimentais e controle (Fig. 4C).



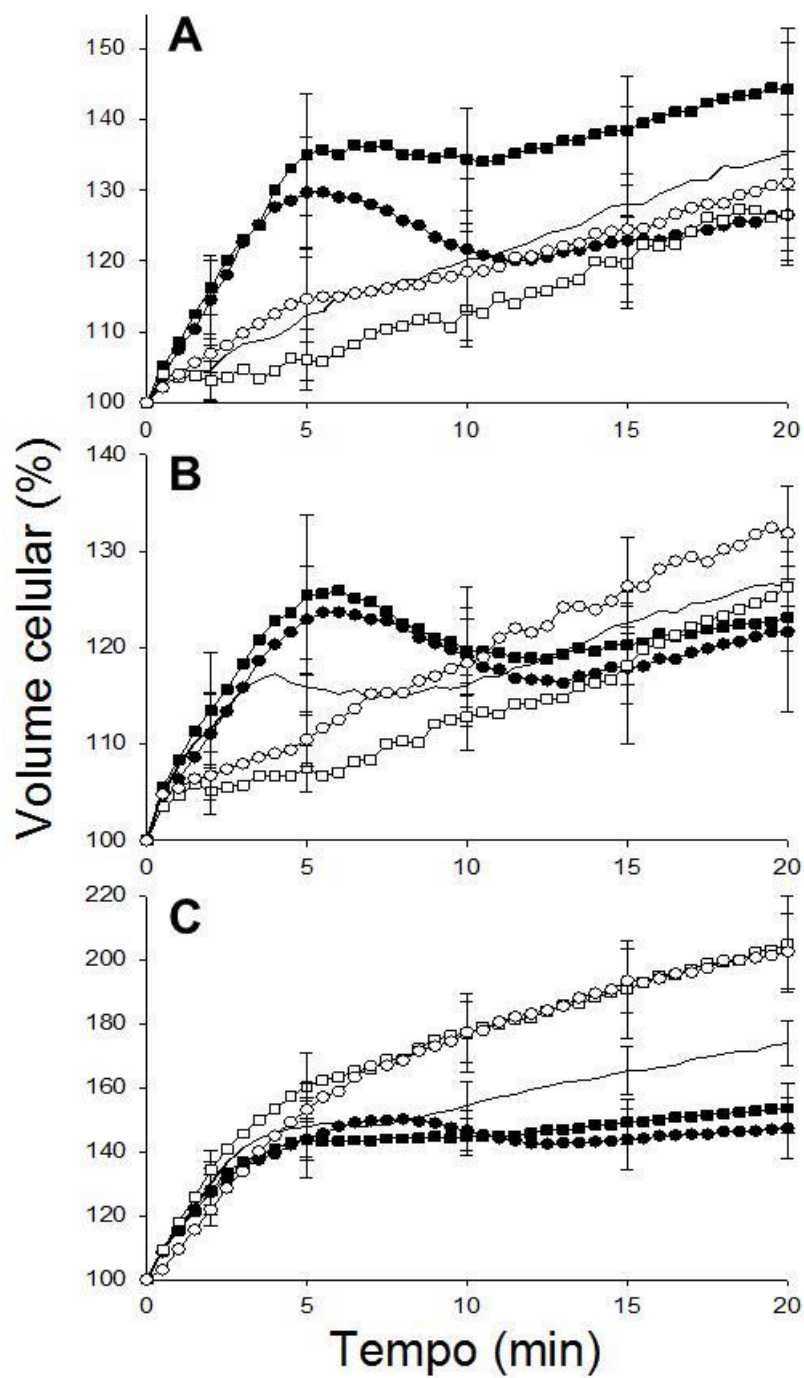
**Figura 3.** Variação de volume das células de esôfago de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B), *L. variegatus* (C) e *H. grisea* (D), sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazios) na osmolalidade com relação ao controle (linha sem símbolos) em 20 (quadrados) e 50 (círculos) %. Não há diferenças entre as condições experimentais e o controle. Note que a escala do gráfico B é diferente dos demais.



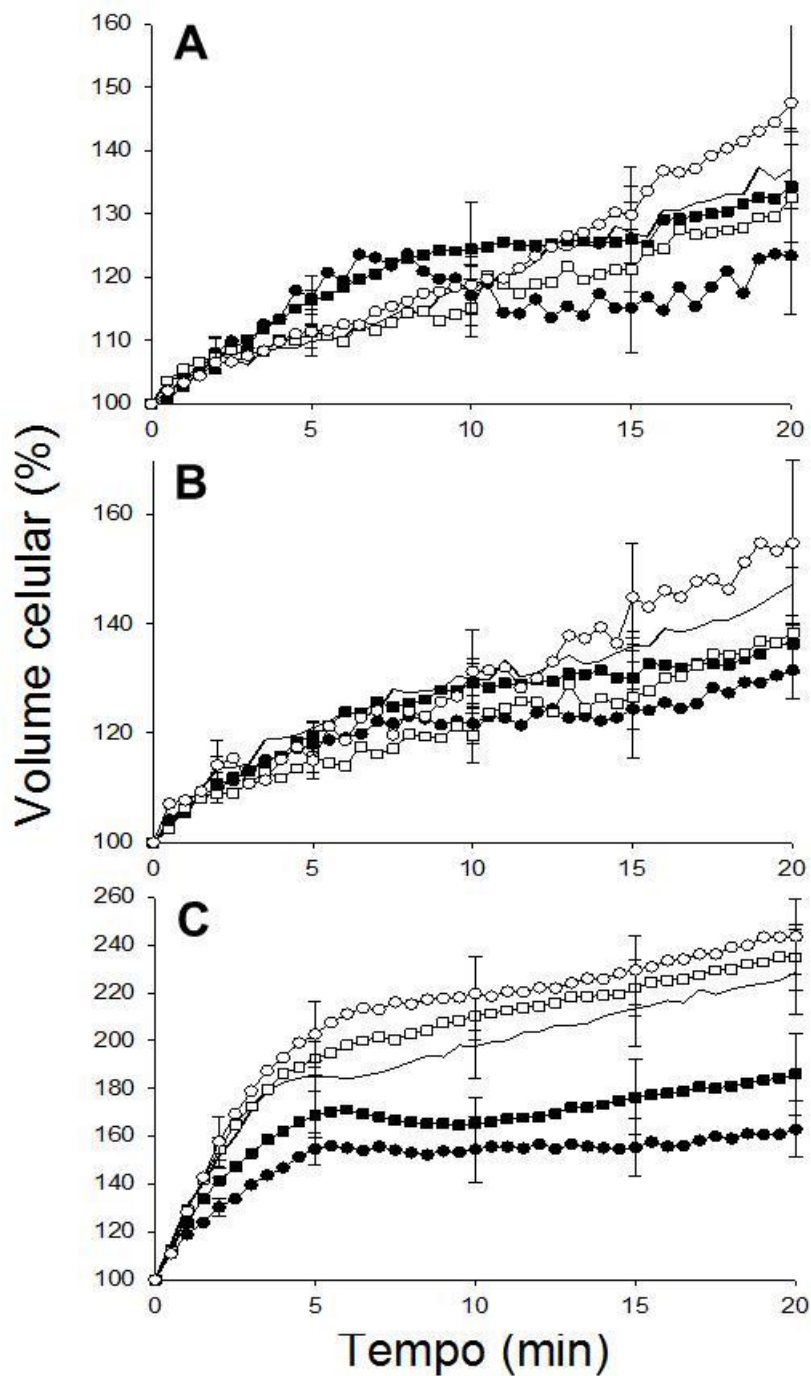
**Figura 4.** Variação de volume das células intestinais de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B), *L. variegatus* (C) e *H. grisea* (D), sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazios) na osmolaridade com relação ao controle (linha sem símbolos) em 20 (quadrados) e 50 (círculos) %. Os asteriscos representam diferenças entre o ponto onde se encontra o asterisco e o controle.

Com relação às respostas das células intestinais de *A. lixula* e *H. grisea* ao choque osmótico na presença de bloqueadores de transportadores de membrana, verificou-se que, assim como na ausência dos bloqueadores em questão, houve aumento de volume celular ao longo do tempo em todas as condições experimentais e no controle (Figs. 5 e 6). Sob redução em 20% na osmolalidade, as células de *A. lixula* apresentaram volume superior na presença de  $\text{HgCl}_2$  do que sob ausência de bloqueadores em 10 minutos de exposição. A partir de 15 minutos, o volume dessas células, em solução de  $\text{HgCl}_2$ , se mostrou superior ao das expostas à furosemida e ao das não expostas a bloqueadores. Além disso, neste mesmo tempo, as células expostas à ouabaína apresentaram maior volume com relação às normais (sem bloqueadores). Sob choque hiperosmótico de 20%, as células de *A. lixula* apresentaram maior volume quando expostas ao  $\text{HgCl}_2$  do que as expostas aos demais bloqueadores em 2 minutos de experimento, do que essas e as normais a partir de 5 minutos. Nas condições controle e hiper 50, a partir de 5 minutos foram verificados volumes celulares superiores sob  $\text{HgCl}_2$  do que sob ouabaína, furosemida, e ausência de bloqueadores. O mesmo ocorreu para as células de *H. grisea* nas condições hiposmóticas, mas sob a hipo 50 percebeu-se também que em 20 minutos as células expostas à furosemida apresentaram volume maior do que as normais, e sob a hipo 20 a diferença entre a exposição ao  $\text{HgCl}_2$  e as demais condições se deu desde os 2 minutos de experimento. No controle e sob as condições hiperosmóticas, as células dessa mesma espécie, a partir de 2 minutos de experimento, tiveram aumento mais

pronunciado de volume quando expostas ao  $\text{HgCl}_2$  do que aos outros bloqueadores e à solução sem estes. Ainda, no controle e no hiper 50, em 15 minutos, estas células apresentaram volume superior em solução com furosemida do que em solução normal (sem bloqueadores). E no tempo final dos experimentos hiperosmóticos foi verificado volume inferior sob ausência de bloqueadores do que sob a presença de qualquer um deles (Tab. 1).



**Figura 5.** Variação de volume das células intestinais de *A. lixula*, sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazios) na osmolalidade com relação ao controle em 20 (quadrados) e 50 (círculos) %, na presença de ouabaína (A), furosemida (B) e HgCl<sub>2</sub> (C).

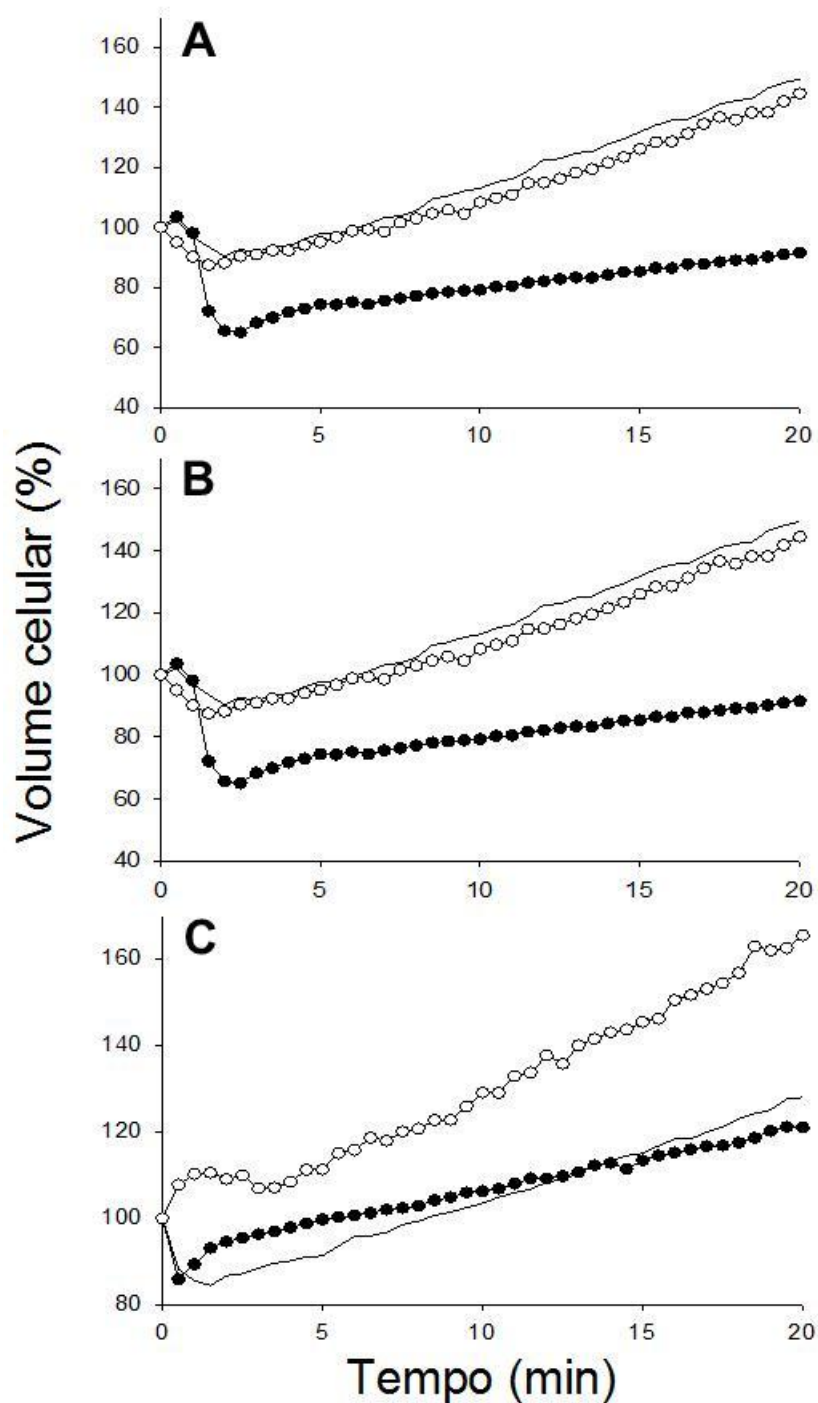


**Figura 6.** Variação de volume das células intestinais de *H. grisea*, sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazios) na osmolalidade com relação ao controle em 20 (quadrados) e 50 (círculos) %, na presença de ouabaina (A), furosemida (B) e HgCl<sub>2</sub> (C).

**Tabela 1.** Diferenças na resposta de volume celular diante de desafio osmótico, em cada solução e tempo de incubação, entre os bloqueadores ou entre estes e a ausência dos mesmos. H=HgCl<sub>2</sub>; O=ouabaína; F=furosemda; N=normal ou sem bloqueadores.

	<b>Tempo 2 (min)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b><i>A. lixula</i></b>					
<b>Hipo 20%</b>			H>N	H>N,F O>N	H>N,F O>N
<b>Controle</b>		H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F
<b>Hiper 20%</b>	H>F,O	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F
<b>Hiper 50%</b>		H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F
<b><i>H. grisea</i></b>					
<b>Hipo 50%</b>		H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F F>N
<b>Hipo 20%</b>	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F
<b>Controle</b>	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F F>N	H>N,O,F F>N
<b>Hiper 20%</b>	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F N<H,O,F
<b>Hiper 50%</b>	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F	H>N,O,F F>N	H>N,O,F N<H,O,F

A partir do teste de concentração de  $\text{HgCl}_2$  para bloqueio de aquaporina foi possível perceber que a resposta fisiológica das células expostas à concentração de  $50 \mu\text{M}$  foi invertida com relação à das células não expostas a bloqueadores, o que indica que houve bloqueio de aquaporina (Fig. 7B). A concentração de  $10 \mu\text{M}$  não foi suficiente para bloquear as proteínas em questão, pois a resposta celular foi semelhante à sob ausência de bloqueadores (Fig. 7A). E por fim,  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  acarretaram resposta semelhante à obtida sob  $300 \mu\text{M}$ , ou seja, injúria e inchaço sob todas as condições (Figs. 5C e 7C).

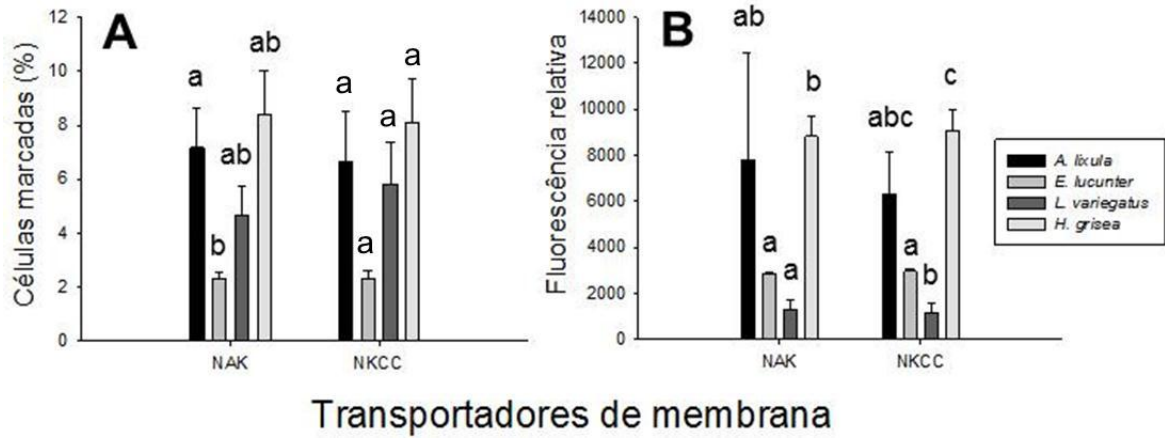


**Figura 7.** Variação de volume das células intestinais de *A. lixula*, sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazios) na osmolalidade com relação ao controle (linha sem símbolos) em 50%, na presença de HgCl<sub>2</sub> sob as concentrações de 10 (A), 50 (B) e 100μM (C).

## Transportadores de membrana

Com relação à porcentagem de células intestinais marcadas, foram verificados valores maiores em *H. grisea* do que em *E. lucunter* e *L. variegatus* para ambos os transportadores e em *E. lucunter* do que em *L. variegatus* para o NKCC (Fig. 8A). Mas acerca da intensidade de fluorescência das células marcadas, que reflete a quantidade de transportadores encontrados nessas, apenas verificou-se maior intensidade em *A. lixula* do que em *E. lucunter* para a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, não tendo sido encontradas mais diferenças (Fig. 8B). Não foram encontradas diferenças intraespecíficas na expressão de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase e NKCC, nem na porcentagem de células marcadas ou na intensidade de fluorescência dessas (Fig. 8).

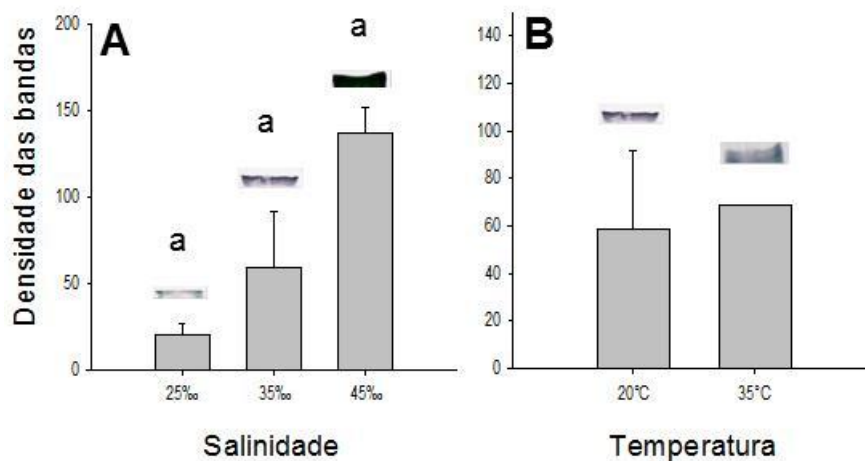
De maneira geral, foi notada baixa expressão dos transportadores de membrana avaliados, pois as amostras experimentais (marcadas) apresentaram pouca diferença de marcação com relação ao branco (controle não marcado).



**Figura 8.** Expressão constitutiva de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase e NKCC no intestino de *A. lixula*, *E. lucunter*, *L. variegatus* e *H. grisea*. Porcentagem de células intestinais marcadas (A) e intensidade de fluorescência das células em 10 mil eventos (B). Letras diferentes representam diferenças entre as espécies em cada transportador de membrana.

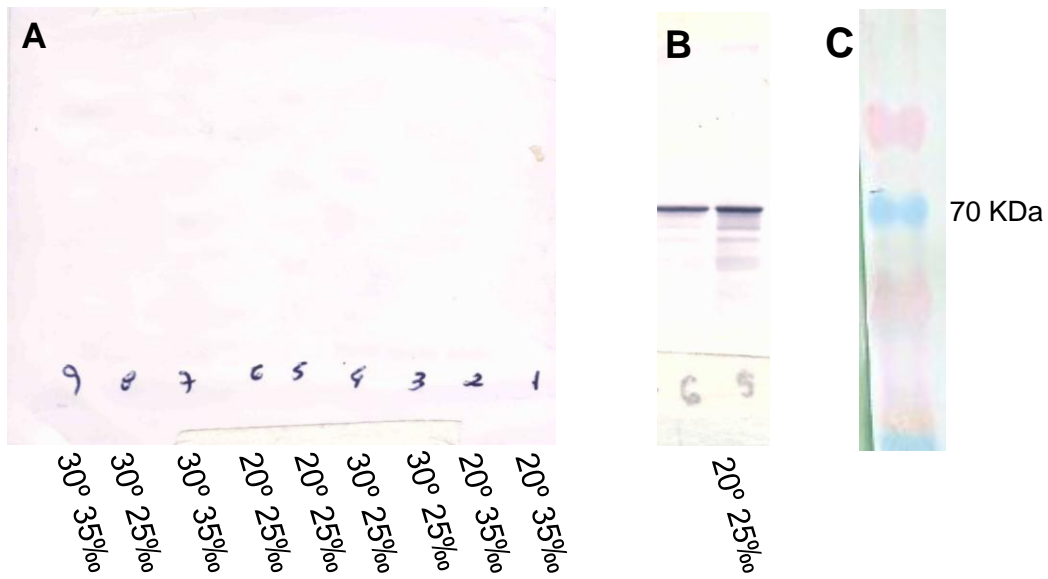
## Expressão de HSP 70

Não foram encontradas diferenças na expressão de HSP70 em *L. variegatus* nas diferentes condições de salinidade (Fig. 9A). Não foi detectada expressão desta proteína nos animais expostos a 10°C, mas houve expressão da mesma no controle a 20°C e nos animais expostos a 35°C (Fig. 9B).



**Figura 9.** Expressão de HSP70 em *L. variegatus* diante de variações de salinidade (A) e temperatura (B). Não houve diferença na expressão de HSP70 nas diferentes salinidades, e não foi possível realizar teste estatístico entre as condições de temperaturas.

Encontrou-se que *A. lixula* não apresenta expressão de HSP70 constitutiva ou induzida (Fig. 10A). Ainda, em *H. grisea* exposta a 20°C e salinidade 25 UPS foi detectada a expressão da mesma proteína em amostras de tecido armazenadas (Fig. 10B).



**Figura 10.** Ausência de expressão de HSP70 em *A. lixula* constitutivamente e diante de alterações de salinidade e/ou temperatura (A), expressão da mesma proteína em *H. grisea* em tecidos armazenados (B), marcador de peso molecular (C).

## DISCUSSÃO

De maneira geral, as células do esôfago e do intestino das 4 espécies apresentaram aumento progressivo de volume, mas mantiveram seus volumes iguais aos controles sob os choques osmóticos impostos. A presença dos bloqueadores nas soluções demonstrou que há ação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, NKCC e principalmente de aquaporina na regulação ou manutenção de volume das células estudadas. A presença destas duas primeiras proteínas nas células em questão foi confirmada por imunofluorescência, sendo detectadas diferenças entre as espécies. Não foram encontradas diferenças na expressão de HSP70 entre a condição controle e as de alteração de salinidade e temperatura em *L. variegatus*.

Embora tenha sido verificado sinal de RVD nas células testadas, é difícil compreender e explicar o motivo do inchaço celular progressivo. Pode-se pensar na possibilidade de uma instabilidade inerente às células de equinodermos, visto que não houve o mesmo problema quando a mesma técnica foi utilizada com anêmonas (Amado *et al.*, 2011) e crustáceos (Amado *et al.*, 2012).

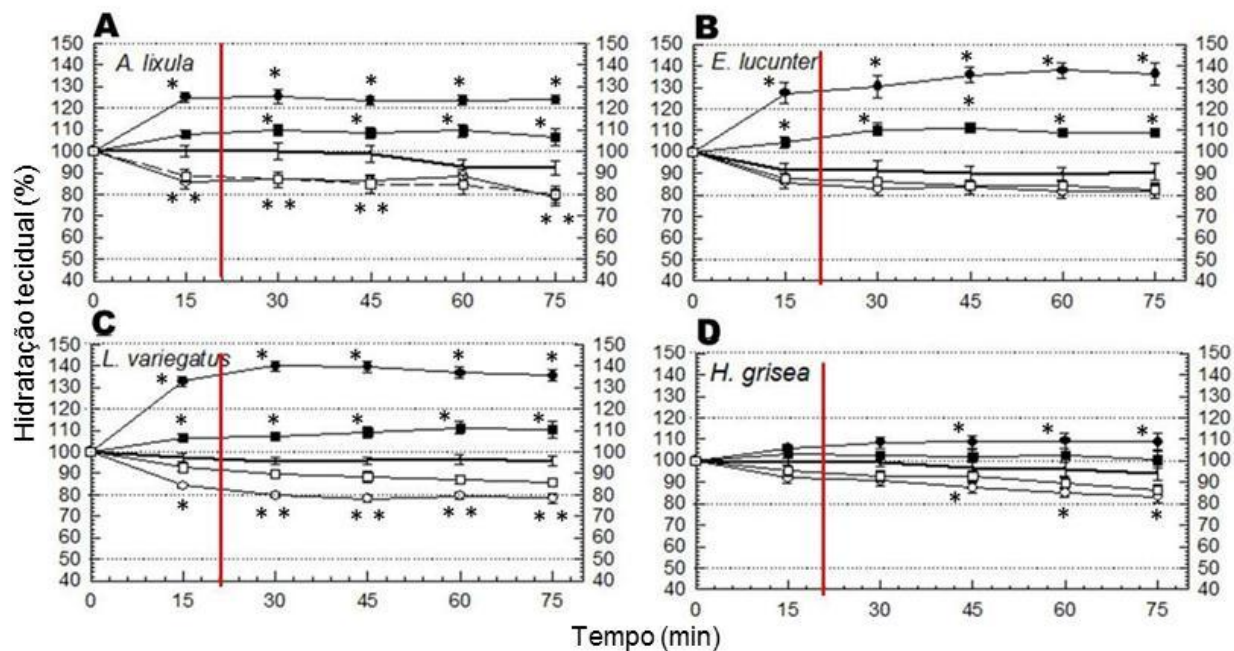
Houve manutenção total do volume celular em células de esôfago de *L. variegatus* sob as condições hipo e hiperosmótica de 20%, e nas intestinais controle de *E. lucunter*, todas as condições de *L. variegatus*, e nas hiperosmóticas em 20% de *H. grisea*. Houve também sinal de redução regulatória de volume (RVD) nos experimentos hiposmóticos de 50% com

células de esôfago de *L. variegatus* e de intestino de *H. grisea*, e no hiposmótico de 20% com células intestinais de *A. lixula*. Tais resultados representam evidências de regulação de volume celular ou de, pelo menos certa manutenção. Esse padrão é similar ao evidenciado em outros estudos, como é o caso de *Luidia clathrata*, que regula volume corporal e celular sob estresse hipo- (Diehl & Lawrence, 1984; Stickle & Diehl, 1987) e hiperosmótico (Diehl & Lawrence, 1984). Além disso, sob baixas salinidades, *Asterias rubens* regula volume corporal (Stickle & Diehl, 1987), *Odontaster validus* regula volume corporal (Stickle & Diehl, 1987) e do fluido celômico (Pearse, 1967) e *Strongilocentrotus droebachiensis* apresenta capacidade de regulação de volume celular (Lange, 1964).

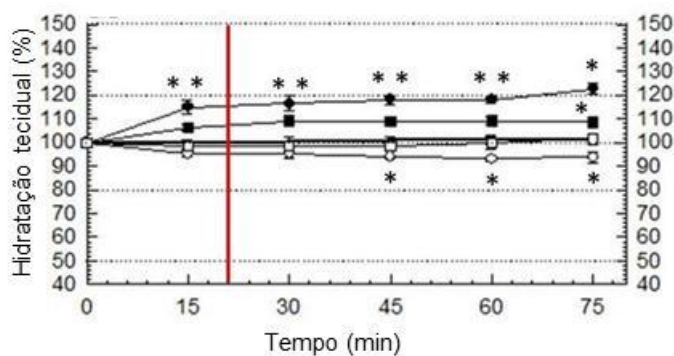
O sinal de RVD aqui identificado é similar ao de outros trabalhos nos quais foi verificada a capacidade de regulação de volume tecidual (Lange, 1964; Diehl & Lawrence, 1984) e corporal (Ellington & Lawrence, 1974) em outros equinodermos expostos a estresse hiposmótico intermediários aos impostos aqui. Esta capacidade pode estar relacionada à baixa habilidade das espécies estudadas para manter estáveis suas concentrações iônicas internas diante de diluição do meio (Castellano *et al.*, em preparação), o que poderia acarretar danos às células se não houvesse sinal nenhum de regulação de volume das mesmas. O oposto é percebido sob estresse hipersalino, onde é verificada maior estabilidade nas concentrações iônicas internas destes animais (Castellano *et al.*, em preparação) e do volume de suas células. Isto provavelmente seja uma estratégia para minimizar possíveis danos

ultraestruturais e microanatômicos (Santos-Gouvea & Freire, 2007), ou mau funcionamento das funções celulares e do organismo (Sabourin & Stickle, 1981; Pierce, 1982; Diehl & Lawrence, 1984; Diehl, 1986; Wehner *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2008), visto que o aumento da salinidade é mais prejudicial e portanto menos tolerável do que a diminuição da mesma (Diehl & Lawrence, 1984; Diehl, 1986; Foglietta & Herrera, 1996; Santos-Gouvea & Freire, 2007; Freire *et al.*, 2011). Tais resultados contradizem dados da literatura, segundo os quais os equinodermos não apresentam capacidade de regulação de volume tecidual sob curtos períodos de exposição (Foglietta & Herrera, 1996), e não possuem mecanismos de ajuste diante de estresse hiperosmótico (Diehl, 1986). Entretanto, corrobora outros que apontam maior estabilidade de volume tecidual sob estresse hiper do que sob hiposmótico (Diehl & Lawrence, 1984).

Os resultados de regulação de volume celular estão de acordo com dados prévios obtidos de experimento com objetivo semelhante (Figs. 11 e 12), mas técnica menos refinada, com tecido inteiro e não com células dissociadas. Vale observar que houve também diferença entre os tempos de experimento, menor no do presente estudo devido ao tempo de viabilidade das células e o tempo de protocolo (salientado em linha vermelha nas Figs. 11 e 12). Apenas não foram compatíveis entre estes dois experimentos as respostas das células e tecidos submetidos aos desafios hiperosmóticos. No experimento prévio houve diminuição da hidratação tecidual, enquanto que as células aqui testadas apresentaram aumento de volume sob as mesmas condições (Figs. 3, 4, 11 e 12).



**Figura 11.** Variação de hidratação tecidual de esôfago de *A. lixula* (A), *E. lucunter* (B), *L. variegatus* (C) e *H. grisea* (D) sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazados) na osmolalidade com relação ao controle em 20 (quadrado) e 50% (círculo). A linha vermelha representa o tempo até o qual foi realizado o ensaio de volume celular do presente trabalho (FONTE: Castellano e Freire, dados não publicados).



**Figura 12.** Variação de hidratação tecidual de intestino posterior de *H. grisea* sob choque osmótico de diminuição (símbolos cheios) e elevação (símbolos vazados) na osmolalidade com relação ao controle em 20 (quadrado) e 50% (círculo). A linha vermelha representa o tempo até o qual foi realizado o ensaio de volume celular do presente trabalho (FONTE: Castellano e Freire, dados não publicados).

Sob as condições hiperosmóticas foi verificada maior estabilidade de volume das células do que sob as hiposmóticas, o que pode ser visto como uma prevenção aos danos mais pronunciados causados pelo excesso de sal do que pela diluição da água, caso não sejam desempenhadas respostas para evitá-los (Santos-Gouvea & Freire, 2007; Freire *et al.*, 2008). Mais além, podem-se extrapolar os presentes resultados para a distribuição dos equinodermos, restritos ao ambiente marinho. Equinodermos são osmoconformadores (Diehl & Lawrence, 1984). Isto acarreta alterações osmoiônicas em seus fluidos corpóreos diante de variação de salinidade ambiental (Stickle & Diehl, 1987), o que representa um desafio às suas células e tecidos. A baixa capacidade de equinodermos para manter estável sua hidratação diante de estresse hiposmótico pode ser a explicação para não terem invadido ambientes de água doce ou de baixas salinidades. Isto é claramente percebido pelo inchaço progressivo das células isoladas, na maioria das condições experimentais aqui impostas.

*H. grisea* apresentou a maior capacidade de manutenção de volume celular seguido de *L. variegatus*, *A. lixula* e *E. lucunter*. O fato de *H. grisea* ter mantido mais estável sua hidratação não é apoiado pela literatura, segundo a qual não ocorre regulação de volume celular em holotúrias (Madrid *et al.*, 1976). Esta divergência pode ser explicada por uma diferença metodológica, pois aqui o experimento foi realizado “*in vitro*”, e o citado foi feito “*in vivo*”. Mas sabe-se que *H. grisea* pode ficar totalmente exposta durante a maré baixa, o que a torna vulnerável à desidratação e conseqüente concentração de seus

fluidos corpóreos. Como esta espécie é pouco capaz de sustentar gradientes iônicos (Castellano *et al.*, em preparação), são necessários mecanismos que permitam tolerar mudanças ambientais de salinidade, como a manutenção de volume celular e tecidual aqui demonstrada. O habitat também pode explicar a maior capacidade de manutenção de volume celular de *L. variegatus* em relação a outros ouriços, já que pode habitar estuários, com flutuações frequentes de salinidade (Drifmeyer, 1981; Ernest & Blake, 1981; Yara Aparecida Garcia Tavares, comunicação pessoal). Além disso, as diferenças de resposta entre os tecidos podem estar associadas a funções distintas dos mesmos.

Com relação à participação de transportadores de membrana e canais de água na regulação de volume celular, foi percebida forte ação das aquaporinas, seguida pela do NKCC e pouco notou-se da ação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase. Bloqueando a aquaporina, foi percebido inchaço celular progressivo até a lise, em todas as condições. Assim, não se sabe se houve de fato apenas o bloqueio das aquaporinas, ou se o resultado obtido se deve à toxicidade do mercúrio (Stacey & Kappus, 1982), que causou injúria às células, e então sua morte por necrose (Pollard & Earnshaw, 2006). Pouco se sabe sobre o funcionamento das aquaporinas, visto que só foram caracterizadas aquaporinas em seis espécies de invertebrados: no nematódio *Caenorhabditis elegans* e em 5 espécies de insetos, *Aedes aegypti*, *Cicadella viridis*, *Rhodnius prolixus*, *Drosophila melanogaster* e *Polypedilum vanderplanki* (Campbell *et al.*, 2008). Percebeu-se que há expressão de NKCC e da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase nas

células intestinais estudadas, e ação destes transportadores de membrana na regulação de volume celular. Este dado corrobora resultado prévio dentro do grupo dos equinodermos, no qual foi verificada a presença de NKCC em celomócitos do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* e o aumento de sua expressão diante de choque hiposmótico de intensidade semelhante ao imposto no presente trabalho (D'Andrea-Winslow *et al.*, 2001). Embora aqui tenha sido avaliada apenas a expressão desta proteína e não sua atividade, estes dois aspectos podem ser relacionados. Assim, os presentes resultados também corrobora estudo realizado com *Apostichopus japonicus*, no qual a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase aumentou progressivamente por cerca de 6h, até que a osmolalidade do fluido celômico do pepino-do-mar atingisse a estabilidade. A partir de então, essa atividade diminuiu (Dong *et al.*, 2008 a). Também se sabe que a expressão e a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase podem aumentar ao longo do desenvolvimento de ouriços-do-mar (Leong & Manahan, 1997; Leong & Manahan, 1999; Marsh *et al.*, 2000). O aumento da atividade desta enzima já foi verificado em invertebrados marinhos osmoconformadores diante de desafio hiposmótico (Corotto & Holliday, 1996; Sommer & Mantel, 1988). Em *H. grisea* foi constatada maior quantidade de células com Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase e NKCC do que em *E. lucunter* e *L. variegatus*. Isto é coerente com a maior capacidade de regulação de volume celular e tecidual de *H. grisea* com relação às outras espécies estudadas (Santos *et al.*, em preparação). Ainda, foram encontradas mais células com NKCC em *E. lucunter* do que em *L. variegatus*. Este resultado indica que a proteína em questão não tem grande

participação na regulação de volume celular nestes animais, visto que *E. lucunter* foi a espécie menos capaz de exercer tal função. As células de *A. lixula* apresentaram maior abundância de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase do que as de *E. lucunter*, o que corrobora a maior estabilidade de volume celular e tecidual sob estresse salino da primeira espécie com relação à segunda (Santos *et al.*, em preparação). A Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase exerce um importante papel na manutenção da estabilidade de volume das células, pois bombeia íons Na<sup>+</sup> para fora das mesmas, compensando o fluxo difusivo deste íon que ocorre em sentido oposto. Assim, há o impedimento de inchaço e lise celular (Hoffmann *et al.*, 2009). O NKCC exerce função absorptiva diante de estresse hiperosmótico, aumentando a concentração intracelular de NaCl, o que é fundamental para que ocorra RVI. Sob estresse hiposmótico, este cotransportador secreta íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> da célula, e a diminuição da concentração de KCl intracelular é fundamental para que ocorra RVD. Assim, o NKCC é de suma importância para a regulação de volume celular, já que os íons transportados são acompanhados por fluxo de água, e há alteração de volume das células envolvidas (Russell, 2000). Cabe salientar que estes dados de aquaporina e transportadores de membrana em equinodermos são praticamente inéditos. Equinodermos são pouco estudados, bem como transportadores de membrana e aquaporinas em invertebrados. Isto justifica as muitas dificuldades metodológicas encontradas e a necessidade de aperfeiçoamentos para complementar os presentes dados.

A verificação de que há expressão de HSP70 em *L. variegatus* está em concordância com resultados prévios em *Paracentrotus lividus*, habitante de regiões entremarés e estuarinas (Byrne, 1990), que também apresenta expressão constitutiva desta proteína (Geraci *et al.*, 2003). A ausência de diferenças na expressão de HSP70 na condição controle e nas experimentais de salinidade pode ser explicada pela alta variabilidade de resposta desta natureza por parte destes animais e pelo pequeno número de réplicas tomadas para cada condição. Percebeu-se ainda que ocorreu indução da expressão da proteína em questão em alguns indivíduos, mas não em todos, o que demonstra a alta variabilidade de respostas do grupo e justifica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos. Em contraste com os resultados aqui obtidos, já foi encontrado aumento na expressão desta proteína em indivíduos juvenis de *Apostichopus japonicus* diante de estresse salino e térmico (Dong *et al.*, 2007; 2008 a) e uma forte relação entre indução de termotolerância e expressão do gene e da proteína HSP70 neste grupo de animais (Dong & Dong, 2008; Meng *et al.*, 2009), ambos sob estresse semelhante ao do presente trabalho.

A ausência de expressão da proteína em questão em *A. lixula* pode ser explicada pelo fato de viver em fundos sublitorais. Isso porque animais que habitam ambientes moderadamente estressantes, como o sublitoral, raramente apresentam a HSR e, quando a apresentam, o seu limiar ocorre sob temperaturas superiores às de seu habitat (Tomanek, 2008). Além disso, sabe-se que o processamento das amostras não deve ser a explicação para a

ausência de expressão de HSP70 em *A. lixula*, pois as amostras de *H. grisea* foram, da mesma forma, utilizadas após armazenamento (não frescas) e ainda assim *H. grisea* apresentou expressão de HSP70.

Habitantes de ambientes instáveis, como costões rochosos da região de entremarés, expressam HSPs sob temperaturas típicas de seu ambiente (Tomanek, 2008). A expressão de HSP70 é maior em organismos que habitam as porções mais altas e expostas dos costões rochosos (Hofmann & Somero, 1995; Dong *et al.*, 2008 b), que são ambientes instáveis em termos de temperatura e salinidade. Este fato é coerente com os presentes resultados, nos quais há expressão de HSP70 em *L. variegatus* (que pode habitar estuários (Drifmeyer 1981; Ernest & Blake 1981; Yara Aparecida Garcia Tavares, comunicação pessoal)) e *H. grisea* (que habita a região de entremarés), mas não em *A. lixula* (restrita a ambientes estáveis de sublitoral).

O fato de indivíduos de *L. variegatus* expostos a 10°C não terem apresentado nem a expressão constitutiva (igual à controle) de HSP70 pode ser explicada pelo tempo de exposição. Já foi verificado que indivíduos juvenis de *Apostichopus japonicus* expostos a alterações de temperatura, de 10 para 20°C e de 20 para 10°C, apresentaram aumento da expressão de HSP70 em ambas as alterações térmicas (Dong *et al.*, 2007). Porém, sob aumento de temperatura o pico de expressão desta proteína ocorreu após 3h de exposição, enquanto que sob resfriamento este pico ocorreu só após 12h (Dong *et al.*, 2007). Além disso, a expressão constitutiva de HSP70 pode ser variável, pois várias amostras da condição controle tiveram de ser eliminadas da análise

devido à ausência de expressão constitutiva de HSP70, assim como todas as de 10°C.

## CONCLUSÃO

Foi observado que as quatro espécies de equinodermos estudadas apresentam capacidade de manter estável o volume de suas células diante de estresse salino, mais sob condições hiper- do que hiposmóticas. Ainda, percebeu-se que o controle do volume celular depende de transportadores de membrana nestes animais. Foi registrada expressão de HSP70 para *L. variegatus* e *H. grisea*, mas não houve um aumento do sinal sob estresses salino e térmico. Dessa forma a hipótese foi refutada.

As células de equinodermos demonstraram alta permeabilidade e tendência de absorver água em qualquer circunstância, o que pode explicar a impossibilidade de invasão de ambientes dulcícolas por estes animais. De maneira geral *L. variegatus* e *H. grisea*, habitantes de ambientes sujeitos a variações ambientais bruscas, extensas e frequentes, apresentaram a maior estabilidade de volume celular sob choque osmótico, e expressão constitutiva de HSP70. Além disso *H. grisea* apresentou a maior porcentagem de células com Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase e NKCC. Estes resultados contribuíram para o entendimento da limitação dos equinodermos para invadir ambientes dulcícolas e dos mecanismos utilizados por estes animais diante de desafios salinos. Como perspectivas, os mecanismos de transporte transmembrana de água e solutos ainda devem ser muito explorados nestes animais, para que possam ser explicadas questões levantadas neste e em outros estudos, como: porque as células de equinodermos incham mesmo sob desafio hiperosmótico? Como

estes animais sobrevivem em ambientes variáveis se, aparentemente, apresentam poucos mecanismos para lidar com tais alterações ambientais?

## REFERÊNCIAS

AÏT-AÏSSA, S, PORCHER, J-M, ARRIGO, A-P, LAMBRÉ, C, 2000. Activations of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology*, **145**:147-157

ALFIERI, RR, BONELLI, MA, PETRONINI, PG, BORGHETTI, AF, 2002. Stabilization of hsp70 mRNA on prolonged cell exposure to hypertonicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1592**:135-140

AMADO, EM, FREIRE, CA, GRASSIC, MT, SOUZA, MM, 2012. Lead hampers gill cell volume regulation in marine crabs: stronger effect in a weak osmoregulator than in an osmoconformer. *Aquatic Toxicology*, **106,107**:95-103

AMADO, EM; VIDOLIN, D; FREIRE, CA; SOUZA, MM, 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **158**:542-551

BAHRNDORFF, S, MARIËN, J, LOESCHCKE, V, ELLERS, J, 2009. Dynamics of heat-induced thermal stress resistance and Hsp70 expression in the springtail, *Orchesella cincta*. *Functional Ecology*, **23**:233-239

BENEDETTI-CECCHI, L, BULLERI, F, CINELLI, F, 1998. Density dependent foraging of sea urchins in shallow subtidal reefs on the west coast of Italy (western Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series*, **163**:203-211

BERGER, MS, EMLET, RB, 2007. Heat-shock response of the upper intertidal barnacle *Balanus glandula*: thermal stress and acclimation. *Biological Bulletins*, **212**:232-241

BERGER, VJ, KHARAZOVA, AD, 1997. Mechanisms of salinity adaptations in marine molluscs. *Hydrobiologia*, **355**:115-126

BUCKLEY, BA, OWEN, M, HOFMANN, GE, 2001. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. *The Journal of Experimental Biology*, **204**:3571-3579

BULLERI, F, BENEDETTI-CECCHI, L, CINELLI, F, 1999. Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **241**:81-95

BYRNE, M, 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*, **104(2)**:275-289

CAMPBELL, EM, BALL, A, HOPPLER, S, BOWMAN, AS, 2008. Invertebrate aquaporins: a review. *Journal of Comparative Physiology, Part B* **178**:935–955

CAPÓ-APONTE, JE, ISEROVICH, P, REINACH, PS, 2006. Characterization of regulatory volume behavior by fluorescence quenching in human corneal epithelial cells. *Journal of Membrane Biology*, **207**:11–22

CHANG, ES, 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone

and stress proteins. *Integrative and Comparative Biology*, **45**:43-50

CHELAZZI, G, SERRA, G, BUCCIARELLI, G, 1997. Zonal recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **212**:1-7

CLARK, MS, FRASER, KPP, BURNS, G, PECK, LS, 2008 a. The Hsp70 heat shock response in the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus*. *Polar Biology*, **31**: 171-180

CLARK, MS, FRASER, KPP, PECK, LS, 2008 b. Lack of an Hsp70 heat shock response in two Antarctic marine invertebrates. *Polar Biology*, **31**:1059-1065

COROTTO, FS, HOLLIDAY, CW, 1996. Branchial Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **113(4)**:361-368

DAHLHOFF, EP, 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual Reviews in Physiology*, **66**:183-207

D'ANDREA-WINSLOW, L, STROHMEIER, GR, ROSSI, B, HOFMAN, P, 2001. Identification of a sea urchin Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC): microfilament-dependent surface expression is mediated by hypotonic shock and cyclic AMP. *The Journal of Experimental Biology*, **204**:147-156

DE MAIO, A, 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, **11(1)**:1-12

DEANE, EE, KELLY, SP, LUK, JCY, WOO, NYS, 2002. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream. *Marine Biotechnology*, **4(2)**:193-205

DIEHL, WJ, 1986. Osmoregulation in echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A **84**:199-205

DIEHL, WJ, LAWRENCE, JM, 1984. The effect of salinity on coelomic fluid osmolyte concentration and intracellular water content in *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A **79(1)**:119-126

DIEHL, WJ, LAWRENCE, JM, 1985. Effect of salinity on the intracellular osmolytes in the pyloric caeca and tube feet of *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A **82(3)**:559-566

DILLER, KR, 2006. Stress protein expression kinetics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **8**:403-424

DONG, S, JI, T, DONG, S, 2007. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Journal of Ocean University of China*, **6(3)**:275-280

DONG, Y, DONG, S, 2008. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein 70 in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, **74**:573-578

DONG, Y, DONG, S, MENG, X, 2008 a. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and HSP70 on sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, **276**:179-186

DONG, Y, MILLER, LP, SANDERS, JG SOMERO, GN, 2008 b. Heat-Shock Protein 70 (HSP70) Expression in Four Limpets of the Genus *Lottia*: Interspecific Variation in Constitutive and Inducible Synthesis Correlates With in situ Exposure to Heat Stress. *The Biological Bulletin*, **215(2)**:173-181

DRIFMEYER, JE, 1981. Urchin *Lytechinus variegatus* grazing on eelgrass, *Zostera marina*. *Estuaries*, **4(4)**:374-375

DROUIN, G, HIMMELMAN, JH, BÉLAND, P, 1984. Impact of tidal fluctuations on echinoderm and mollusk populations. *Canadian Journal of Zoology*, **63**:1377-1387

DuBEAU, SF, PANB, F, TREMBLAYB, GC, BRADLEYA, TM, 1998. Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein HSP70 and confers protection against osmotic shock. *Aquaculture*, **168(1-4)**:311-323

EDER, KJ, LEUTENEGGER, CM, KÖHLER, H-R, WERNER, I, 2009. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**:182-190

ELLINGTON, WR, LAWRENCE, JM, 1974. Coelomic fluid volume regulation and isosmotic intracellular regulation by *Luidia clathrata* (Echinodermata:

Asteroidea) in response to hyposmotic stress. *Biological Bulletin*, **146**:20- 31

ERNEST, RG, BLAKE, NJ, 1981. Reproductive patterns within subpopulations of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **55**:25-37

FEIGE, U, POLLA, BS, 1994. Heat Shock Proteins: the HSP70 family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **50(11-12)**:979-986

FELDHAUS, JW, HEPPELL, SA, LI, H, MESA, MG, 2010. A physiological approach to quantifying thermal habitat quality for redband rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss gairdneri*) in the south Fork John Day River, Oregon. *Environmental Biology of Fishes*, **87**:277-290

FINAN, JD, GUILAK, F, 2010. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry*, **109(3)**:460–467

FINK, AL, 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, **79**:425-449

FINN, RN, CERDÀ, J, 2011. Aquaporin evolution in fishes. *Frontiers in Physiology*, **2**:1-6

FOGLIETTA, LM, HERRERA, FC, 1996. Ionosmotic response of respiratory trees of the holothurian *Isostichopus badionotus* Selenka preincubated in hyper-, iso- and hypo-osmotic sea water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **202**:151- 164

FREIRE, CA, AMADO, EM, SOUZA, LR, VEIGA, MPT, VITULE, JRS, SOUZA, MM, PRODOCIMO, V, 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmorregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **149**:435-446

FREIRE, CA, SANTOS, IA, VIDOLIN, D, 2011. Osmolality and ions of the perivisceral coelomic fluid of the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) upon salinity and ionic challenges. *Zoologia*, **28(4)**:479-487

FRENKEL, L, DIMANT, B, PORTIANSKY, EL, MALDONADO, H, DELORENZI, A, 2008. Both heat shock and water deprivation trigger HSP70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Neuroscience Letters*, **443**:251-256

FUNKENSTEIN, B, PATRUNO, M, RADAELLI, G, 2007. Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of HSP70 in sea bass *Dicentrarchus labrax* exposed to transport stress. *European Journal of Histochemistry*, **51(2)**:125-136

GERACI, F, AGUELI, C, GIUDICE, G, SCONZO, G, 2003. Localization of Hsp70, Cdc2, and cyclic B in sea urchin oocytes in non-stressed conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **310**:748-753

GONDIM, AI, LACOUTH, P, ALONSO, C, MANSO, CLC, 2008. Echinodermata da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Biota Neotropica*, **8**:151-159

GREENWAY, M, 1995. Trophic relationships of macrofauna within a Jamaican seagrass meadow and the role of the echinoid *Lytechinus variegatus* (Lamarck). *Bulletin of Marine Science*, **53(3)**:719-736

HAAS, M, FORBUSH III, B, 2000. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annual Reviews in Physiology*, **62**:515-534

HAMANN, S, KIILGAARD, JF, LITMAN, T, ALVAREZ-LEEFMANS, FJ, WINTHER, BR, ZEUTHEN, T, 2002. Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching. *Journal of Fluorescence*, **12(2)**:139-145

HARTL, FU, 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**:571-580

HÄUSSINGER, D, 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochemistry Journal*, **313**:697-710

HENDLER, G, MILLER, JE, PAWSON, DL, KIER, PM. Sea stars, sea urchins, and allies. Echinoderms of Florida and the Caribbean. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1995; 392pp

HOFFMANN, EK, DUNHAM, PB, 1995. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *International Review of Cytology*, **161**:172-262

HOFFMANN, EK, LAMBERT, IH, PEDERSEN, SF, 2009. Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiology Reviews*, **89**:193–277

HOFMANN, GE, 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Comparative Biology*, **45**:247-255

HOFMANN, GE, SOMERO, GN, 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and HSP70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *The Journal of Experimental Biology*, **198**:1509-1518

HORISBERGER J-D, LEMAS V, KRAEHNBIHL J-P, ROSSIER BC, 1991. Structure-function relationship of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *Annual Review of Physiology*, **53**:565-584

IWAMA, GK, AFONSO, LOB, TODGHAM, A, ACKERMAN, P, NAKANO, K, 2004. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *The Journal of Experimental Biology*, **207**:15-19

JI, T, DONG, Y, DONG, S, 2008. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature. *Aquaculture*, **283**:180-187

JORGENSEN, PL, HÅKANSSON, KO, KARLISH, SJD, 2003. Structure and mechanism of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, **65**:817-849

JUNQUEIRA, AOR, VENTURA, CRR, CARVALHO, ALPS, SCHMIDT, AJ, 1997. Population recovery of the sea urchin *Lytechinus variegatus* in a

seagrass flat (Araruama Lagoon, Brazil): the role of recruitment in a disturbed environment. *Invertebrate Reproduction & Development*, **31**:143-150

KAPLAN, JH, 2002. Biochemistry of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *Annual Review of Biochemistry*, **71**:511-535

KING, LS, KOZONO, D, AGRE, P, 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**:687-698

KÜLTZ, D, 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, **67**:225–257

LANGE, R, 1964. The osmotic adjustment in the echinoderm, *Strongilocentrotus droebachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **13**:205- 216

LEONG, PKK, MANAHAN, DT, 1997. Metabolic importance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during sea urchin development. *The Journal of Experimental Biology*, **200**:2881–2892

LEONG, PKK, MANAHAN, DT, 1999. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early development and growth of an antarctic sea urchin. *The Journal of Experimental Biology*, **202**:2051–2058

MADRID, E, ZANDERS, IP, HERRERA, FC, 1976. Changes in coelomic fluid and intracellular ionic composition in holothurians exposed to diverse sea water concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **54**:167–174

MARINELLI, RA, PHAM, L, AGRE, P, LARUSSO, NF, 1997. Secretin Promotes Osmotic Water Transport in Rat Cholangiocytes by Increasing Aquaporin-1 Water Channels in Plasma Membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, **272(20)**:12984-12988

MARSH, AG, LEONG, PKK, MANAHAN, DT, 2000. Gene expression and enzyme activities of the sodium pump during sea urchin development: implications for indices of physiological state. *Biological Bulletins*, **199**:100–107

MAYER, MP, BUKAU, B, 2005. HSP70 chaperones: cellular functions and molecular mechanisms. *Cellular and Molecular Life Science*, **62**:670-684

McPHERSON, BF, 1969. Studies on the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. *Bulletin of Marine Science*, **19(1)**:194-213

MENG, X, JI, T, DONG, Y, WANG, Q, DONG, S, 2009. Thermal resistance in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) with differing thermal history: The role of Hsp70. *Aquaculture*, **294**:314-318

MILLER, LP, HARLEY, CDG, DENNY, MW, 2009. The role of temperature and desiccation stress in limiting the local-scale distribution of the owl limpet, *Lottia gigantea*. *Functional Ecology*, **23**:756-767

MONGIN, AA, ORLOV, SN, 2001. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiology*, **8**:77-88

PARSELL, DA, LINDQUIST, S, 1993. The function of heat-shock proteins in

stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, **27**:437-496

PEARSE, J. S., 1967. Coelomic water volume control in the Antarctic sea-star *Odontaster validus*. *Nature*, **216**:1118-1119

PIERCE, SK, 1982. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *Biological Bulletin*, **163**:405-419

PIERCE, SK, POLITIS, AD, 1990. Ca<sup>2+</sup> activated cell volume recovery mechanisms. *Annual Review of physiology*, **52**:27-42

PLACE, SP, HOFMANN, GE, 2001. Temperature interactions of the molecular chaperone HSC70 from the eurythermal marine goby *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology*, **204**:2675-2682

POLLARD, TD, EARNSHAW, WC. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006; 799pp

POLTRONIERI, C, MACCATROZZO, L, SIMONTACCHI, C, BERTOTTO, D, RHEE, J-S, RAISUDDIN, S, LEE, K-W, SEO, JS, KI, J-S, KIM, I-C, PARK, HG, LEE, J-S, 2009. Heat shock protein (hsp) gene responses of the intertidal copepod *Igriopus japonicas* to environmental toxicants. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **149(1)**:104-112

RIBEIRO-COSTA, C. S., ROCHA, R. M. *Invertebrados: manual de aulas práticas*. 2a ed. Ribeirão Preto: Holos, 2006

RUSSELL, JM, 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological Reviews*, **80(1)**:211-276

SABOURIN, T. D. & STICKLE, W. B., 1981. Effects of salinity on respiration and nitrogen excretion in two species of echinoderms. *Marine Biology*, **65**:91-99

SÁNCHEZ-JÉREZ, P, CESAR, A, CORTEZ, FS, PEREIRA, CDS, SILVA, SL R, 2001. Distribuição espacial de las poblaciones de erizos más abundantes de la costa sudeste del litoral de São Paulo (Brasil). *Ciencia Marina*, **27(1)**:139-153

SANTOS-GOUVEA, I A, FREIRE, CA, 2007. Effects of hypo- and hypersaline seawater on the microanatomy and ultrastructure of epithelial tissues of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) of intertidal and subtidal populations. *Zoological Studies*, **46(2)**:203-215

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia Animal – adaptação e meio ambiente. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Santos, 2002; 611pp

SHARP, DT, GRAY, IE, 1962. Studies on factors affecting the local distribution of two sea urchins, *Arbacia punctulata* and *Lytechinus variegatus*. *Ecology*, **43(2)**:309-313

SOMERO, GN, 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology*, **42**:780-789

SOMMER, MJ, MANTEL, LH, 1988. Effect of dopamine, cyclic AMP, and pericardial organs on sodium uptake and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity in gills of the

green crab *Carcinus maenas* (L). *Journal of experimental zoology*, **248(3)**:272-277

STACEY, NH, KAPPUS, H, 1982. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **63(1)**:29-35

STICKLE, WB, DENOUX, GJ, 1976. Effects of *in situ* tidal salinity fluctuations on osmotic and ionic composition of body fluid in Southeastern Alaska Rocky intertidal fauna. *Marine Biology*, **37**:125-135

STICKLE, WB, DIEHL, WJ, 1987. Effects of salinity on echinoderms. In M Jangoux, JM Lawrence, eds. Echinoderm studies II. Rotterdam: AA Balkema, pp. 235-285

SUGUIMOTO, C., 2005. Instituto de pesquisa em aquicultura e aquariologia. Disponível em <[http://www.ipaq.org.br/modules.php?name=Aquarioes&op=mostrar\\_especie&id=421&nome\\_map=t,s,c,b,>](http://www.ipaq.org.br/modules.php?name=Aquarioes&op=mostrar_especie&id=421&nome_map=t,s,c,b,>). Acesso em 5 de novembro de 2008

TIMOFEEV, MA, SHATILINA, ZhM, BEDULINA, DS, PROTOPOPOVA, MV, KOLESNICHENKO, AV, 2008. Application of heat shock proteins as stress markers in aquatic organisms using endemic Baikal amphipods as an example. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44(3)**:310- 313

TOMANEK, L, 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat-shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, **81(6)**:709-717

VIDOLIN, D, SANTOS-GOUVEA, IA, FREIRE, CA, 2007. Differences in ion regulation in the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea). *Journal of Marine Biological Association of the UK*, **87**:769-775

WATANABE, S, KANEKO, T, AIDA, K, 2005. Aquaporin-3 expressed in the basolateral membrane of gill chloride cells in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* adapted to freshwater and seawater. *Journal of Experimental Biology*, **208**:2673-2682

WEHNER, F, OLSEN, H, TINEL, H, KINNE-SAFFRAN, E, KINNE, RKH, 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*, **148**:1-80

WHEATLY, MG, GAO, Y, 2004. Molecular biology of ion motive proteins in comparative models. *The Journal of Experimental Biology*, **207**:3253-3263